

Aus der Klinik für Neurologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. L. Timmermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

ER-Stress in
primären murinen Neuronen- und Mikroglia-Kulturen
induziert durch in vitro Parkinson- und Alzheimer-
Schädigungsmodelle

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Charlotte Sophie Plaschka
aus Lüneburg
Marburg an der Lahn, 2020

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 09.03.2020**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Dodel

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Jansen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Abstract.....	5
3	Einleitung.....	7
3.1	Alzheimer-Krankheit.....	7
3.2	Parkinson-Krankheit.....	12
3.3	Mikroglia und Neuroinflammation	16
3.4	ER-Stress und Unfolded Protein Response	18
3.5	ER-Stress in neurodegenerativen Erkrankungen	24
3.6	Auswirkung von ER-Stress auf mikrogliale Zellen	26
3.7	Alzheimer- und Parkinson-Zellkulturmodelle	29
3.8	Zielsetzung	30
4	Material.....	33
5	Methoden	40
5.1	Zellkultivierung	40
5.2	Amyloid-beta 1-42 Lösung und Alterung	41
5.3	6-Hydroxydopamin-Lösung und -Aliquotierung	42
5.4	Toxizitätsassays	42
5.4.1	MTT-Assay	42
5.4.2	Doppelfärbung.....	43
5.5	Aktivitätsassays für mikrogliale Zellen	43
5.5.1	Zytokin-ELISA.....	43
5.5.2	Griess-Assay	45
5.6	Bestimmung definierter ER-Stress-Proteine	45
5.6.1	Proteinlysierung und Konzentrationsbestimmung	45
5.6.2	SDS PAGE	46
5.6.3	Western Blot	47
5.7	Kontrollen.....	48
5.8	Statistische Auswertung.....	49
6	Ergebnisse.....	50
6.1	Das neuronale 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell.....	50
6.1.1	Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung	50
6.1.2	Proteinexpression	52
6.2	Das mikrogliale 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell.....	54

6.2.1	Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung	54
6.2.2	Inflammatorische Aktivität	56
6.2.3	Proteinexpression	58
6.2.4	CHOP in mesenzephalen Mikroglia	60
6.3	Das neuronale Amyloid-beta1-42 Schädigungsmodell	60
6.3.1	Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung	60
6.3.2	Proteinexpression	62
6.4	Das mikrogliale Amyloid-beta1-42 Schädigungsmodell	65
6.4.1	Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung	65
6.4.2	Inflammatorische Aktivität	67
6.4.3	Proteinexpression	69
7	Diskussion	71
7.1	Das 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell	71
7.1.1	Zelltypabhängige ER-Stress-Aktivierung	72
7.1.2	Einfluss des Entwicklungsstandes auf die Regulation von ER-Stress	75
7.1.3	6-Hydroxydopamin kann murine mikrogliale Zellen nicht aktivieren	78
7.2	Das Amyloid-beta 1-42 Schädigungsmodell.....	79
7.2.1	Amyloid-beta1-42 führt nicht zur Induktion von ER-Stress in kortikalen Neuronen	80
7.2.2	Amyloid-beta1-42 eignet sich nicht als ER-Stressor in mikroglialen Zellen..	82
7.3	Fazit.....	83
7.4	Ausblick.....	86
8	Literaturverzeichnis	88
9	Abbildungsverzeichnis.....	105
10	Tabellenverzeichnis	106
11	Abkürzungsverzeichnis.....	107
12	Anhang.....	111
12.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	111
12.2	Danksagung	112

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Alzheimer- (AD) und die Parkinson-Krankheit (PD) sind die zwei großen neurodegenerativen Erkrankungen unserer Zeit. Beide Erkrankungen verbindet das Auftreten fehlgefalteter und akkumulierter Proteine, deren Oligomere toxisch wirken und neuronalen Zelltod bewirken können. Weiterhin sind beide Erkrankungen gekennzeichnet durch neuroinflammatorische Prozesse, denen aktivierte Mikroglia zugrunde liegen. ER-Stress ist ein Mechanismus, der an Neurodegeneration beteiligt ist. Unter anderem wird er durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine aktiviert und führt durch Induktion verschiedener Signalkaskaden zur Wiederherstellung der Zellhomöostase. Versagen diese Gegenregulationsmechanismen, setzen Mechanismen ein, die zum programmierten Zelltod führen.

Zielsetzung: In dieser Arbeit wurde die Induktion von ER-Stress durch Amyloid-beta 1-42 (A β 1-42) Oligomere und 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) in murinen neuronalen und mikroglialen Alzheimer- und Parkinson-Zellkulturmodellen untersucht. Zudem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen ER-Stress-Induktion und inflammatorischer Aktivität der mikroglialen Zellen besteht.

Methodik: Verwendet wurden embryonale primäre murine kortikale Neurone und mesenzephalische Mikroglia, gewonnen am Entwicklungstag 13-14, welche mit toxischen Konzentrationen von A β 1-42 Oligomeren und 6-OHDA behandelt wurden. Diese wurden zuvor mittels MTT-Assay und Doppelfärbung ermittelt. Unter Zuhilfenahme von Zyokin-ELISA und Griess-Assay wurde zudem die inflammatorische Aktivität der mikroglialen Zellen gemessen durch Bestimmung der proinflammatorischen Enzyme Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) sowie von Nitrit. Anschließend erfolgte die Messung von Konzentrationsänderungen zuvor definierter Proteine der Signalkaskaden ATF6 [englisch: *Activating Transcription Factor 6*], GRP78 [englisch: *Glucose Regulated Protein 78*], CHOP [englisch: *C/EBP Homologous Protein*] und Caspase 3 mittels Western Blot.

Ergebnis: Die Behandlung mit 6-OHDA führte in neuronalen Zellen zur Induktion von Caspase 3 und ATF6. Eine veränderte Proteinexpression im neuronalen A β 1-42 Schädigungsmodell konnte trotz suffizient induzierter Schädigung nicht nachgewiesen werden. In Mikroglia konnte sowohl durch 6-OHDA

als auch A β 1-42 eine verringerte Expression von GRP78 nachgewiesen werden. Der Nachweis von CHOP in mikroglialen Zellen war in beiden Schädigungsmodellen nicht möglich. Darüber hinaus war eine Aktivierung der Mikroglia durch beide Substanzen nicht möglich.

Diskussion: Die gewonnenen Ergebnisse lassen auf eine teilweise Aktivierung einiger ER-Stresskaskaden durch 6-OHDA in neuronalen Zellen schließen. Die Induktion von ER-Stress in mikroglialen Zellen sowie im neuronalen A β 1-42 Schädigungsmodell gelang nicht. Die etablierten Schädigungsmodelle sind damit für die weitere Erforschung von ER-Stress in neurodegenerativen Erkrankungen eher ungeeignet. Jedoch lassen die gewonnenen Ergebnisse einen möglichen Rückschluss auf einen Einfluss des Entwicklungsstandes der Zelle auf ER-Stress-Regulationsprozesse zu.

2 Abstract

Background: Alzheimer's and Parkinson's disease are the two great neurodegenerative diseases of our time. Both diseases share an accumulation of misfolded proteins, the oligomers of which have a toxic effect and may cause neuronal cell death. Furthermore, both diseases are characterized by neuro-inflammatory processes caused by activated microglia. ER stress is one of the mechanisms in neurodegeneration. Caused inter alia by an accumulation of misfolded proteins, ER stress activates different signalling cascades needed to restore cell homeostasis. Failure of these regulatory mechanisms induces apoptosis.

Objective: This thesis explores the effects of ER stress induced by amyloid-beta 1-42 (A β 1-42) oligomers and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on murine neuronal and microglial cell culture models of Alzheimer's and Parkinson's disease. Furthermore, the microglial activation was measured to gain deeper insight into the relationship between ER stress and neuroinflammation.

Methodology: Embryonic primary murine cortical neurons and mesencephalic microglia were treated with toxic concentrations of A β 1-42 oligomers and 6-OHDA, the effectivity of which was identified by means of MTT assay and double staining. Furthermore, ELISA and Griess assay were used to determine the inflammatory activity of microglial cells by measuring TNF- α , IL-6 and nitrite level. Subsequently, changes in the concentration of Activating Transcription Factor 6 (ATF6), Glucose Regulated Protein 78 (GRP78), C/EBP Homologous Protein (CHOP) and Caspase 3 were identified using Western blot analysis.

Results: 6-OHDA treatment leads to the induction of Caspase 3 and ATF6 in neuronal cells. There is no evidence that A β 1-42 treatment induces a change in neuronal protein concentration. Both treatments result in a decrease in the protein concentration of GRP78, CHOP expression could not be detected in microglial cells. Furthermore, 6-OHDA and A β 1-42 treatment fails to induce activation of microglia.

Discussion: The results show the partial induction of ER stress activating signalling cascades in neuronal cells under 6-OHDA treatment. A β 1-42 treatment could not induce ER stress in microglial or neuronal cells. The established cell culture models are rather not suited for further investigation of ER stress regulation in neurodegenerative diseases. The results, however, indicate that

the state of development of the cell might have an influence on the regulatory mechanisms activated by ER stress.

3 Einleitung

Neurodegeneration beschreibt den Verlust von Nervenzellgewebe. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen gehören dementsprechend Erkrankungen, bei denen es zu einem fortschreitenden Untergang von Nervenzellen kommt. Die häufigsten Erkrankungen dieser Gruppe sind die Alzheimer-Krankheit und die Parkinson-Krankheit (Dorsey et al., 2007; Hoozemans et al., 2012).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Körperzellen sind Neurone nicht in der Lage, sich zu teilen (Trepel, 2008). Aufgrund der zentralen Rolle des Gehirns und den fehlenden Mechanismen zur Zellerneuerung sind die Zellverluste neurodegenerativer Erkrankungen somit besonders dramatisch und bislang medikamentös schlecht behandelbar.

3.1 Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (englisch: *Alzheimer's Disease* (AD)) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, die charakterisiert ist durch extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen und der intrazellulären Bildung von Neurofibrillenbündeln kombiniert mit einem progredienten Verlust des Gedächtnisses (Alzheimer, 1907; Braak et al., 1991; Cras et al., 1991; Mandelkow et al., 1998; Selkoe, 2013)

Die erste Beschreibung der Alzheimer Krankheit erfolgte durch Alois Alzheimer im Jahr 1906. Alzheimer erkannte nicht nur die bis heute gültigen klinischen Charakteristika seiner Patientin, er beschrieb auch als erster die zugrundeliegenden histopathologischen Veränderungen (Alzheimer, 1907; Cipriani et al., 2011). Von Einzelfällen, wie Alzheimers Patientin es war, kann heute lange nicht mehr die Rede sein. Seit 1906 hat die Prävalenz der an AD Erkrankten dramatisch zugenommen (Prince et al., 2016).

Zu den typischen Symptomen der AD zählen zunächst ein zunehmender Verlust des episodischen Gedächtnisses sowie der Orientierung. Gefolgt wird dies vom Verlust exekutiver Funktionen, Aufmerksamkeit, Sprache und räumlich-visueller Funktionen. Zu Störungen der Motorik und Sensorik kommt es erst im späten Krankheitsverlauf. Insgesamt vergehen vom Beginn der ersten Symptome bis zum Tod der Patienten etwa 10 bis 20 Jahre (Albert et al., 2011; Selkoe, 2013).

Die Diagnose der AD ist immer eine Ausschlussdiagnose, die nach kognitiver oder ergänzender neuropsychologischer Testung in Kombination mit detaillierten Labor- und Liquoranalysen und einer zerebralen Bildgebung getroffen werden kann (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Eine definitive Diagnose war lange nur *post mortem* durch neuropathologische Untersuchungen möglich. Heutzutage gilt die Diagnose durch die Kombination von spezifischen Biomarkern mit klinischen Symptomen als gesichert und ist bereits früh im Krankheitsverlauf möglich (Dubois et al., 2014).

Die Prävalenz von Demenz beträgt weltweit etwa 50 Millionen (Prince et al., 2015; WHO, 2015). Der überwiegende Teil, ca. drei Viertel, gehört zur Gruppe der Demenzen vom Alzheimerstyp (Weyerer, 2005). Die Prävalenz in Deutschland beträgt derzeit ca. 1,3 Millionen, mit einem deutlichen Anstieg der Prävalenz bei über 60-Jährigen (Alzheimer Europe, 2013; Ziegler et al., 2009). 2050 werden aufgrund der aktuellen Prävalenzrate ca. 3 Millionen Erkrankte erwartet (Bickel, 2018), obwohl sich in aktuellen Trends die Inzidenzrate in westlichen Staaten leicht rückläufig zeigte (Prince et al., 2016).

Laut statistischem Bundesamt haben Demenzerkrankungen im Jahr 2015 zu Kosten in Höhe von 15,128 Millionen Euro geführt (Statistisches Bundesamt, 2018). Die jährlichen Kosten pro Patient betragen in Deutschland durchschnittlich 13,080 Euro (Reese et al., 2011). Auf Grundlage der zu erwartenden Bevölkerungsentwicklung wird die AD eine hohe finanzielle und pflegerische Belastung darstellen und neue Konzepte und Ideen für die Integration und Versorgung demenziell Erkrankter erfordern.

Zu den klassischen histopathologischen Veränderungen zählen extrazelluläre Amyloid Plaques und intrazelluläre Neurofibrillenbündel (englisch: *neurofibrillary tangles* (NFTs)), begleitet von neuronalem Zelluntergang, Synapsenverlust, dystrophen Neuriten und reaktiver Gliose. Häufig findet sich auch eine Amyloid Angiopathie (Alzheimer, 1907; Braak et al., 1991; Braak et al., 1997; Duyckaerts et al., 2009; Streit et al., 2018).

NFTs bestehen aus hyperphosphoryliertem und fehlgefaltetem Tau. Tau ist ein lösliches Protein, welches physiologisch intrazellulär an Mikrotubuli bindet und somit zur Stabilisierung des Zytoskeletts beiträgt. Die Menge an NFTs schreitet

mit dem Krankheitsverlauf fort und korreliert mit der Schwere der Demenz (Bierer et al., 1995). Die Hirnregionen in denen sich NFTs nach und nach ausbreiten wurden von Braak in 6 Stadien eingeteilt und lassen sich grob in drei Gruppen unterteilen: 1) enthorhinaler Kortex, 2) limbisches System und 3) Isokortex (Braak et al., 1991).

Die meisten Amyloid Plaques, auch senile Plaques genannt, befinden sich im Isokortex (Arnold et al., 1991). Im Gegensatz zu den NFTs korreliert hier die Anzahl der Plaques jedoch nicht eng mit dem Ausmaß der kognitiven Defizite (Arriagada et al., 1992). In der direkten Umgebung von Plaque-Formationen finden sich gehäuft dystrophe Neuriten, eine Verringerung der synaptischen Dichte sowie Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Diese Beobachtung führte zu der Idee, dass die Plaques selber oder Bestandteile von ihnen eine toxische Wirkung besitzen (Kidd, 1964; Serrano-Pozo et al., 2011).

Hauptbestandteil der Plaques ist das Amyloid-beta (A β) Peptid (Glenner et al., 1984; Sevigny et al., 2016). Dessen Vorläuferprotein ist das Amyloid-Vorläufer-Protein (englisch: *amyloid-precursor-protein* (APP)), ein großes Transmembranprotein, welches physiologisch exprimiert wird (Kang et al., 1987). Durch eine membrangebundene β -Sekretase (englisch: *β -site APP-cleaving enzyme* (BACE)) wird das Protein prozessiert und die Extrazellulärdomäne wird freigesetzt. Durch anschließendes Schneiden einer γ -Sekretase, zu dessen Bestandteilen Presenilin 1 (PS1) oder 2 (PS2) gehören, wird A β in den Extrazellulärraum freigesetzt. Die γ -Sekretase kann an verschiedenen Stellen schneiden, so dass verschieden lange Peptide entstehen: A β 1-38, A β 1-40 oder A β 1-42 (Haass, 2004). Je länger die entstandenen Peptide sind, desto höher ist ihr Aggregationspotential (Selkoe et al., 2016). So besitzt z.B. A β 1-42 *in vivo* ein sehr hohes Aggregationspotential und ist Hauptbestandteil der senilen Plaques (Haass et al., 2007).

Auch A β kommt physiologischer Weise beim Gesunden vor und kann in Liquor und Plasma nachgewiesen werden (Seubert et al., 1992; Blennow et al., 2010). Die genaue Funktion des Proteins konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden. Neuere Ergebnisse geben allerdings Hinweise darauf, dass A β und APP Teil eines Feedback-Mechanismus sind, über welchen die neuronale Erregbarkeit reguliert wird (Kamenetz et al., 2003). Zudem wird vermutet, dass APP und nicht amyloidogene Fragmente des APP mit Lipidstoffwechsel und mito-

chondrialer Funktion interagieren und eine neuroprotektive Funktion besitzen (Corrigan et al., 2012; Lopez Sanchez et al., 2018; Lopez Sanchez et al., 2017). Die schon bekannten pathologischen Veränderungen im Umfeld der Plaques kombiniert mit genetischen Erkenntnissen legten den Grundstein für die Hypothese der Amyloidkaskade (englisch: *Amyloid Cascade Hypothesis*). (siehe Abbildung 1) (Haass et al., 2007; Hardy et al., 1992; Selkoe, 1991; Selkoe et al., 2016). So fand man heraus, dass der Genlocus von APP auf Chromosom 21 liegt und Patienten mit Trisomie 21 gehäuft AD im Verlauf der Erkrankung entwickeln (Glenner, 1979; Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987). Darüber hinaus konnte man zeigen, dass Mutationen im APP- oder PS1/PS2-Gen zur familiären Form der AD führen (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995). Dahingegen haben Träger einer Missense Mutation im APP-Gen, welche eine verringerte Prozessierung von APP zur Folge hat, ein deutlich geringeres Risiko an AD zu erkranken (Jonsson et al., 2012).

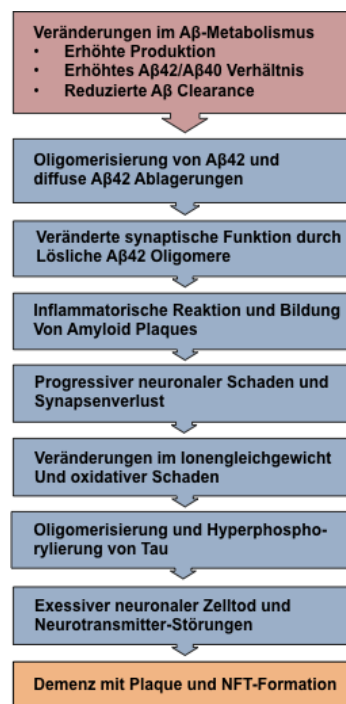


Abbildung 1: Hypothese der Amyloidkaskade.

Schematische Darstellung der Amyloidkaskade. Veränderungen im Aβ Metabolismus führen zu erhöhten Konzentrationen an Aβ1-42 und dessen Oligomerisierung. Nachfolgend entstehen synaptische Störungen, Zellschäden, Inflammation und Bildung von hyperphosphoryliertem Tau. Am Ende der Kaskade entsteht Demenz durch Neuronenverlust mit Amyloid Plaques und Neurofibrillenbündeln.

Quelle: Eigene Abbildung, angelehnt an (Haass et al., 2007)

Der Amyloidkaskade zufolge liegen Veränderungen im A β Metabolismus mit erhöhter A β Produktion und reduziertem Abbau allen weiteren Veränderungen zu Grunde. A β aggregiert zunächst zu Oligomeren, dann zu Fibrillen, welche den Hauptbestandteil seniler Plaques bilden. Daraufhin folgen die Bildung von NFTs und schließlich neuronaler Zellverlust.

Genauere Untersuchungen konnten zeigen, dass es nicht senile Plaques, sondern vielmehr lösliche A β Oligomere sind, die einen toxischen Effekt besitzen, wohingegen Plaques als Reservoir dieser Oligomere fungieren. So korreliert beispielsweise die Menge an löslichen Oligomeren im Gegensatz zur Anzahl an senilen Plaques sehr gut mit dem Ausmaß der kognitiven Defizite (Lue et al., 1999; Naslund et al., 2000). Ebenso korreliert die Dichte von A β Oligomeren rund um eine Plaqueformation negativ mit der synaptischen Dichte (Koffie et al., 2009). Mittlerweile weiß man, dass A β Oligomere zu Gedächtnisverlust führen, indem sie im Hippocampus die Langzeitpotenzierung (englisch: *Long-Term-Potentiation* (LTP)) reduzieren und Langzeitdepression (englisch: *Long-Term-Depressen* (LTD)) verstärken (Li et al., 2009; Lue et al., 1999). Langzeitpotenzierung und -depression sind wichtige Elemente der synaptischen Plastizität und Lernprozessen zugrundeliegender Mechanismen. Diese Erkenntnisse machen A β und v.a. A β 1-42 nach wie vor zu einem zentralen Element der Alzheimer-Forschung.

Die Behandlung von Demenzpatienten gestaltet sich schwierig. Eine kausale Therapiemöglichkeit gibt es derzeit nicht. Die wenigen verfügbaren Therapeutika sind Cholinesterasehemmer und der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonist und zielen darauf ab, Veränderungen in den Transmittersystemen auszugleichen. Hiermit lässt sich eine Progression der Erkrankung allenfalls gering aufhalten. Allgemeinmaßnahmen umfassen z.B. Gedächtnistraining.

Insgesamt gibt es bisher wenig therapeutische Ansätze zur Behandlung von Demenzerkrankten und nach neuen Therapeutika wird intensiv geforscht. Die klinische Forschung hat sich zu diesem Zweck in den letzten Jahren verstärkt mit der Entwicklung von passiven und aktiven Immunisierungsstrategien beschäftigt (Dodel, 2013; Selkoe et al., 2016). In Phase 2 Studien konnte ein positiver Effekt von Aducanumab, einem Antikörper gegen A β gezeigt werden.

Dieser führte zu einer Reduktion der Plaquelast sowie einem verlangsamten Voranschreiten der kognitiven Defizite (Sevigny et al., 2016). Die laufenden Phase 3 Studien wurden jedoch kürzlich abgebrochen, da ein Erreichen des primären Endpunktes nicht wahrscheinlich war (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2019). Ebenso zeigten sich in Phase 3 Studien zu Solanezumab, einem weiteren Antikörper gegen A β , signifikante Effekte bei Patienten mit milder AD (Doody et al., 2014). Ein weiterer Versuch ist die Entwicklung von Sekretasehemmern, die zu einem verbesserten A β 1-40/A β 1-42-Verhältnis zugunsten des A β 1-40 führen sollen.

3.2 Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (englisch: *Parkinson's Disease* (PD)) ist nach der AD die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Dorsey et al., 2007). In der Kategorie der Bewegungsstörungen stellt die PD mit Abstand die häufigste Erkrankung dar. Gekennzeichnet ist die PD durch den Verlust dopaminergischer Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Braak et al., 2009).

Charakteristischerweise leiden PD-Patienten unter einem Parkinsonsyndrom (PS), welches sich auszeichnet durch (Ruhe-)tremor, Rigor (Steifigkeit der Muskulatur), Bradykinese (verlangsamte Bewegungen) und einer posturalen Instabilität (gestörte Haltungsstabilität). Die Liste der Ursachen eines Parkinsonsyndroms ist lang. Man unterscheidet ein idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS), atypische Parkinsonsyndrome wie die Multisystematrophie (MSA), die Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP), die Demenz mit Lewy-Körpern (DLK) und die Kortikobasale Degeneration (CBD), symptomatische Parkinsonsyndrome und genetische Formen des PS. Auch eine Reihe von Differentialdiagnosen können ein Parkinson-ähnliches Bild hervorrufen. Das IPS ist jedoch mit einem Anteil von 75% die mit Abstand häufigste Ursache eines Parkinsonsyndroms (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016).

Zusätzlich weisen viele Patienten fakultative nicht-motorische Symptome auf, welche sich in sensorische, vegetative, psychische und kognitive Symptome unterteilen lassen. Häufige sind z.B. REM- (englisch: *Rapid Eye Movement*) Schlaf-Verhaltensstörungen, Riechstörungen, Depressionen, Demenz und Störungen der Temperatur- und Blutdruckregulation (Deutsche Gesellschaft für

Neurologie, 2016). Diese nicht-motorischen Symptome werden von den Patienten häufig als schlimmer und in ihrer Lebensqualität stärker einschränkend empfunden als motorische Symptome (Schrag et al., 2000). Z.T. treten diese Symptome bereits Jahre vor der Manifestation eines PS auf. Typische Frühsymptome sind REM-Schlaf-Verhaltensstörungen und Riechstörungen (Chaudhuri et al., 2006)

Die Diagnose eines IPS wird klinisch gestellt. Verwendet werden hierfür am häufigsten die *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*. Eine definitive Diagnose ist nur histopathologisch *post mortem* möglich. Die diagnostische Sicherheit lässt sich durch erfahrene Kliniker im Bereich von Bewegungsstörungen deutlich erhöhen und liegt bei ca. 80%. (Hughes et al., 2002). Asymmetrischer Beginn sowie gutes Ansprechen auf L-Dopa gelten als typisch für ein IPS, wohingegen eine geringe L-Dopa-Sensitivität oder eine ausgeprägte autonome Beteiligung auf ein atypisches PS hinweisen. Vor der Diagnose müssen symptomatische Formen und Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Verfahren und Tests, die in unklaren Fällen zur Hilfe gezogen werden können z.B. eine Polysomnographie, nuklearmedizinische Verfahren oder die Sonographie der SN (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Pathogenese des IPS. Im Folgenden wird für das IPS weiterhin die Abkürzung PD verwendet.

Die PD ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. In Deutschland gibt es derzeit ca. 219.579 an PD Erkrankte (Gustavsson et al., 2011). Es wird erwartet, dass die Zahl der Erkrankten bis 2030 um 50% ansteigt (Dorsey et al., 2007). Die Prävalenz in Europa, Nord- und Südamerika ist mit 66-1500 pro 100.000 (von Campenhausen et al., 2005) wesentlich höher, als in Asien und Afrika (Kalia et al., 2015). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, das Verhältnis beträgt etwa 3:2 (de Lau et al., 2006).

Wichtigster bekannter Risikofaktor für die Entstehung einer PD ist das Alter. Inzidenz und Prävalenz steigen ab einem Alter von 60 Jahren deutlich an (Driver et al., 2009). Weitere Risikofaktoren sind umweltbezogen. Dazu gehören unter anderem Betablocker, Kontakt mit Pestiziden oder vorangegangene Kopfverletzungen (Noyce et al., 2012).

Darüber hinaus konnten diverse Gene identifiziert werden, deren Träger ein erhöhtes Risiko haben, an autosomal dominanter oder rezessiver Form der PD zu erkranken. Insgesamt sind bisher 24 Genloci bekannt, die PD-assoziiert sind (Nalls et al., 2014). Unter ihnen finden sich LRRK2, SNCA und parkin. Vermutlich liegt die Entstehung der PD begründet in einer Mischung aus genetischer Prädisposition und entsprechenden Umweltfaktoren (Kalia et al., 2015).

Die PD ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Lewy-Körperchen sowie progredientem Zelltod dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* (SN) (Forno, 1996; Holdorff et al., 2013).

Die SN ist Teil der Basalganglienschleife und an der Steuerung willkürlicher Bewegung beteiligt. Dopamin ist als Neurotransmitter maßgeblich an dieser Steuerung beteiligt und gehäuft in den Neuronen der SN zu finden. Durch Untergang der dopaminergen Neurone entsteht ein Transmitterungleichgewicht zu Ungunsten des Dopamins und Bewegungsstörungen resultieren (Hornykiewicz, 1963, 1966).

Lewy-Körperchen sind nach ihrem Entdecker Friedrich H. Lewy 1912 benannt (Rodrigues e Silva et al., 2010). Entsprechend ihrem Erscheinungsbild unterscheidet man die kugeligen Körperchen der Perikarien (Lewy Körper) und die fadenförmigen der Axone (Lewy Neuriten) (Dickson, 2018; Forno, 1996). Mit ihrem Auftreten vergesellschaftet ist die dem Krankheitsprozess zugrundeliegende progrediente Neurodegeneration. Die Relevanz seiner Entdeckung wurde von Lewy oder zu seinen Lebzeiten nicht erkannt. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten, mit der Entdeckung von α -Synuklein und der neuropathologischen Stadieneinteilung basierend auf Lewy-Körperchen durch Braak, sind Lewy-Körperchen in den Fokus der neurologischen Forschung gerückt (Braak et al., 2003; Holdorff et al., 2013).

Ebenso wie bei der AD liegt Lewy-Körperchen aggregiertes und fehlgefaltetes Protein zugrunde. Bei der PD handelt es sich bei diesem Protein um α -Synuklein (Dickson, 2018). α -Synuklein ist ein 140 Aminosäuren langes Protein, welches sich physiologisch v.a. an Nervenendigungen in membranassoziierter Form findet. Seine genaue Funktion ist jedoch noch unklar. Vermutlich spielt α -Synuklein eine Rolle im Vesikeltransport und bei der Stabilisierung von Membranen (Vargas et al., 2014). In membranassoziierter Form hat α -Synuklein eine

Helixstruktur. In den Proteinaggregaten hat α -Synuklein jedoch eine β -Faltblattstruktur und bildet Filamente. Analog zur AD sind es v.a. lösliche Oligomere, die einen toxischen Effekt besitzen (Bendor et al., 2013).

2002 teilte Braak die PD neuropathologisch in 6 Stadien ein. Dem zugrunde liegt die Beobachtung eines immer gleichen Ausbreitungsmusters der Lewy-Körperchen und einer Korrelation zwischen Fortschritt des Befalls und Schwere der Symptome (Braak et al., 2003). Zunächst sind nur wenige Neurone im Bereich des zentralen, peripheren, autonomen und enterischen Nervensystems betroffen, von welchen sich die Krankheit von peripher nach zentral in einem stereotypen Muster ausbreitet (Braak et al., 2010). Als erstes betroffen sind das olfaktorische System und die dorsalen Kerne des *N. glossopharyngeus* und des *N. vagus* (Stadien 1,2). Dieses Ausbreitungsmuster erklärt frühe Symptome wie Riechstörungen und gastrointestinale Motilitätsstörungen. Als nächstes betroffen sind die *Substantia nigra*, das basale Mittel- und Vorderhirn und der Mesokortex (Stadien 3,4). In diesen Stadien treten motorische Symptome auf. In den letzten beiden Stadien ist der Neokortex betroffen (Stadien 5,6) (Braak et al., 2003). Motorische Kardinalsymptome entstehen in der Regel erst, wenn 50-70% der dopaminergen Neurone der SN untergegangen sind (Fearnley et al., 1991). Der neurodegenerative Prozess beginnt dementsprechend bereits Jahrzehnte vor der Manifestation motorischer Symptome.

Das stereotype Ausbreitungsmuster der pathologischen Veränderungen sowie der Nachweis von Lewy-Körperchen in transplantierten mesenzephalen Neuronen Jahrzehnte nach Transplantation legten den Verdacht eines Prion-ähnlichen Geschehens nahe, welches der Proteinaggregation und Nervenzelldegeneration zugrunde liegt. Die Bezeichnung Prion setzt sich zusammen aus „*proteinaceous infectious particle*“. Es handelt sich um fehlgefaltete Proteine PrP^{SC} (Prusiner, 1982). Bei Infektion mit Prionen induzieren diese eine Konformationsänderung und Aggregation der zellulären Normvariante PrP^C, woraufhin es zum Zelltod kommt. Auch α -Synuklein, Tau und A β induzieren bekanntermaßen Konformationsänderung und Aggregation. In der Tat gelang es Prusiner und Kollegen ein neues Prionprotein nachzuweisen, welches für die Entstehung von MSA verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich um eine α -Synuklein-Variante mit Prioneneigenschaften. Ob PD auch durch α -Synuklein Prionen entsteht, ist derzeit noch unklar (Prusiner et al., 2015).

Bislang gibt es noch keine kausale Therapie der PD. Die medikamentöse Therapie basiert daher auf rein symptomatischen Strategien. Da die motorischen Symptome durch einen relativen Dopaminmangel zu erklären sind, zielen die zur Verfügung stehenden Medikamente v.a. auf eine Erhöhung des zerebralen Dopaminspiegels ab. Besonders in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien wird die medikamentöse Einstellung jedoch immer schwieriger. Es kommt vermehrt zu Wirkungsfluktuationen mit Phasen gesteigerter sowie geringer Beweglichkeit. Auch die benötigten Dopamindosen werden immer höher. Wenn die Grenze der medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten erreicht ist, kann die Implantation eines Tiefenhirnstimulators erwogen werden. Dieser führt über Stimulation des *Ncl. Subthalamicus* zu einer Verbesserung der motorischen Symptome. Darüber hinaus sind supportive Maßnahmen wie z.B. Physiotherapie, Logotherapie oder auch Selbsthilfegruppen für an der PD Erkrankte enorm wichtig (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016).

Vor dem Hintergrund der hohen Prävalenz dieser Erkrankung und der rein symptomatischen Therapiemöglichkeiten ist die Entwicklung neuer Medikamente, welche kausal wirken oder eine Progression des Nervenzellverlustes aufhalten können, enorm wichtig.

3.3 Mikroglia und Neuroinflammation

Mikroglia sind die residenten Immunzellen des Gehirns und gehören entsprechend ihrer Funktion dem mononukleären Makrophagensystem an. Als diese sind sie an einer Vielzahl homöostatischer Funktionen wie z.B. Phagozytose, Neurogenese und Modulation synaptischer Verbindungen beteiligt, sowie in der Lage inflammatorische Prozesse zu vermitteln (Frost et al., 2016; Kettenmann et al., 2011; Sato, 2015). Aktivierte Mikroglia migrieren an den Ort des Geschehens und schütten dort proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) sowie Stickstoffmonoxid (NO) aus (Kettenmann et al., 2011). So konnten in allen neurodegenerativen Erkrankungen erhöhte Zytokinlevel nachgewiesen werden (Blum-Degen et al., 1995; Dobbs et al., 1999; Frautschy et al., 1998; Pan et al., 2011; Yates et al., 2000).

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Mikrogliose in räumlicher Assoziation zu Amyloid-Plaques histopathologisches Korrelat der AD. Die Aktivierung und Migration der Zellen wird u.a. durch Amyloid induziert (Fuger et al., 2017) und die Zahl der aktivierten Zellen korreliert positiv mit der Zahl der senilen Plaques, der histopathologischen Stadieneinteilung und Demenzschwere (Mrak, 2012). Bildgebende *in vivo* Studien geben zudem Anlass zu der Vermutung, dass mikrogliale Aktivierung und Migration v.a. in frühen Stadien der AD kennzeichnend sind (Cagnin et al., 2001; Hamelin et al., 2016). Bei der Aktivierung mikroglialer Zellen können A β 1-42 Oligomere als Liganden fungieren und über verschiedene Rezeptoren, hauptsächlich jedoch TLR- (englisch: *toll-like receptor*) und NLRP3 Inflammasom-vermittelt, inflammatorische Aktivität und Zytokinausschüttung induzieren (Terrill-Usery et al., 2014). Zudem gibt es hinreichend Evidenz dafür, dass Mikroglia in der Lage sind, Amyloid-beta zu phagozytieren. Auch hier sind es die Oligomere, welche besonders effektiv phagozytiert werden und zu einer Reduktion des toxischen Amyloid-beta beitragen und so zunächst eine wahrscheinlich neuroprotektive Rolle einnehmen. Jüngere Studien konnten jedoch zeigen, dass die Phagozytose von Amyloid-beta den Zelltod der phagozytierenden Zelle induziert und zu einer Freisetzung des zuvor phagozytierten Materials in den Extrazellulärraum führt (Baik et al., 2016). Kontrovers hierzu sind die vorläufigen Ergebnisse zu dem zuvor beschriebenen Anti-Amyloid-Antikörper Aducanumab (siehe 3.1), durch welchen eine suffiziente Phagozytose und Plaquereduktion erzielt werden konnte (Sevigny et al., 2016). Zudem sind anhaltende Inflammation und erhöhte Konzentrationen von Zytokinen und NO nachweislich neurotoxisch und können zu Neurodegeneration mit ausgeprägten Schäden führen (Chao et al., 1992; Jeohn et al., 1998). So gibt es Hinweise dafür, dass aktivierte Mikroglia nicht nur eine Folge der degenerativen Veränderungen sind, sondern diese durch prolongierte Entzündung und Neurotoxizität sogar aufrecht erhalten. Dieser Zusammenhang wurde von Sue Griffin modellhaft als „*cytokine circle*“ beschrieben (Griffin, 2006).

Auch bei der PD ist die mikrogliale Aktivierung histopathologisches Korrelat. *Post mortem* Untersuchungen an Parkinson Patienten konnten aktivierte Mikroglia in der SN zeigen sowie erhöhte Konzentrationen von Zytokinen (McGeer et al., 1988). Darüber hinaus konnte bei PD-Patienten in PET-Scan Untersu-

chungen eine erhöhte Zahl aktivierter Mikroglia nachgewiesen werden (Gerhard et al., 2006). Whitton postulierte 2007 die These, dass eine überschießende Aktivierung von Mikroglia für die Genese von PD sogar ursächlich ist (Whitton, 2007). Im Mittelhirn findet sich die höchste Dichte an mikroglialen Zellen (Lawson et al., 1990) und dopaminerge Neurone der SN sind besonders empfindlich gegenüber Zytokinen (Block et al., 2007; McGuire et al., 2001). Möglicherweise liegt hierin die Ursache des charakteristischen Verlusts dopaminerger Neurone begründet. Ein abschließender Beweis für diese These konnte jedoch noch nicht erbracht werden.

Neuere genetische Studien konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen veränderter immunologischer Funktion und dem Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen nachweisen. CD33 und TREM2 (englisch: *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*) werden von myeloischen Zellen exprimiert. Mutationen in diesen Genen sind bekannte Risikofaktoren für das Entstehen neurodegenerativer Erkrankungen. Sie supprimieren die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und reduzieren die Phagozytose von Aβ durch Mikrogliazellen. In Folge nimmt die Zahl an Amyloid-Plaques und kognitiven Störungen der Mutationsträger zu (Bradshaw et al., 2013; Painter et al., 2015). Damit spielen Mikroglia und immunologische Prozesse vermutlich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie hier am Beispiel der AD und PD aufgeführt.

3.4 ER-Stress und Unfolded Protein Response

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein zytoplasmatisches Zellorganell und Teil des sekretorischen Systems der Zelle. An den Ribosomen des ERs findet die Proteintranskription, die Proteinsynthese aus einzelnen Aminosäuren, und im Lumen des ERs die Faltung und Glykosylierung der neu entstandenen Proteine statt. An diesen Prozessen beteiligt sind zahlreiche Proteine und Enzyme, welche in ihrer Gesamtheit das ER-Qualitätskontrollsystem darstellen. Insgesamt werden ca. 30% aller neusynthetisierten Proteine hier aufgrund von Fehlerhaftigkeit aussortiert und der ER-assoziierten Protein Degradation (englisch: *Endoplasmic-reticulum associated protein degradation* (ERAD)) zugeführt (Schubert et al., 2000). Alle anderen Proteine werden in Vesikel

verpackt weitertransportiert. Darüber hinaus dient das ER als Kalzium-Speicher und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion. Das ER ist somit ein multifunktionelles Organell und für die Aufrechterhaltung von Zellfunktionen besonders wichtig (Varma et al., 2015).

Verschiedene Zustände können zur Störung der Integrität des ERs führen und das Organell so unter „Stress“ setzen. Dieser Zustand wird in der Literatur gemeinhin als ER-Stress bezeichnet. Die Faltungskapazität des ERs ist ein fragiler Zustand, der stark von den Umgebungsbedingungen abhängt. Bekannte Störfaktoren sind Akkumulation ungefalteter Proteine, gestörter Redox-Status, Hypoxie, Störungen der Kalzium-Homöostase, Hyperglykämie und -lipidämie sowie virale Infektionen (Fedoroff, 2006; Fonseca et al., 2011; Gaut et al., 1993; Gorlach et al., 2006; Zhang et al., 2012).

Ein erhöhtes Aufkommen ungefalteter Proteine überschreitet die Faltungskapazität des ERs. Dies kann physiologisch sein, z.B. bei der Differenzierung von B- in Plasmazellen oder pathologisch, wie es bei der AD oder der PD zu beobachten ist (Hoozemans et al., 2007; Viana et al., 2012). Durch den Anstau ungefalteter Proteine kommt es dazu, dass die Zelle ihren homöostatischen Zustand verlässt und in Stress gerät. Verschiedene Signalkaskaden werden nun in Gang gesetzt, zusammengefasst unter dem Namen *Unfolded Protein Response* (UPR). Durch Aktivierung der UPR sollen Störfaktoren beseitigt und die Zellhomöostase wieder hergestellt werden (siehe Abbildung 2). So kommt es im Zuge der Aktivierung zu einer Erhöhung der Faltungskapazität (Kozutsumi et al., 1988), einer Verminderung der Proteinsynthese (Harding et al., 1999) und einem erhöhten Abbau fehlerhafter Proteine mittels ERAD (Travers et al., 2000). Gelingt es der Zelle nicht, wieder einen homöostatischen Zustand zu erreichen, wird schlussendlich die Apoptose eingeleitet (Szegezdi et al., 2006).

Es gibt drei verschiedene Signalwege, deren Ausgangsproteine ATF6 (englisch: *Activating Transcription Factor 6*), PERK (englisch: *Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*) und IRE1 α (englisch: *Inositol-Requiring Enzyme 1 α*) darstellen (siehe Abbildung 2) (Schroder et al., 2005). Alle drei Proteine sind transmembranöse Bestandteile der ER-Membran und mit ihrer luminalen Seite an GRP78 (englisch: *Glucose Regulated Protein 78*) gebunden. Bei GRP78 handelt es sich um ein Chaperon, welches am Faltungsprozess neu

synthetisierter Proteine beteiligt ist. Es bindet an ungefaltete Proteine im ER und verhindert deren Aggregation (Gething, 1999). Bei sehr hohem Aufkommen ungefalteter Proteine dissoziiert GRP78 von den inaktiven Ausgangsproteinen, wodurch diese aktiviert werden (Bertolotti et al., 2000).

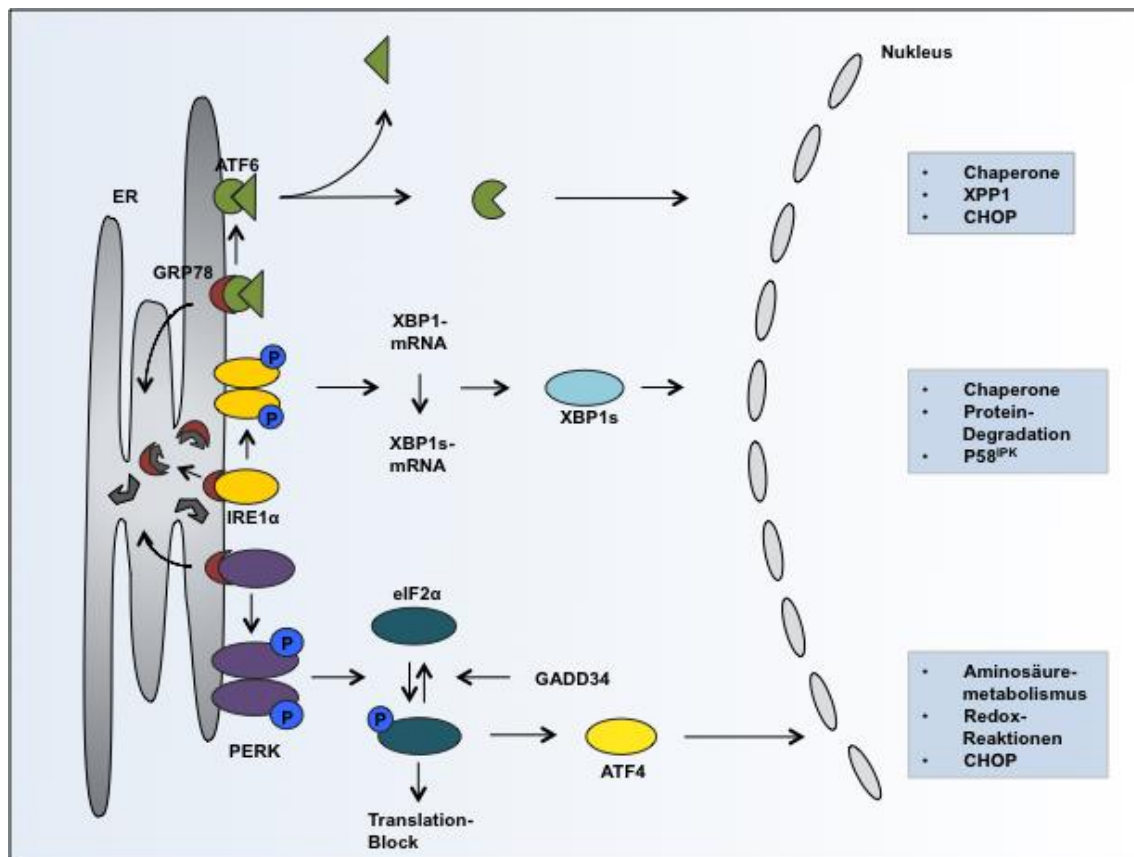


Abbildung 2: UPR Signalwege.

Die Signalproteine PERK (*Pancreatic ER kinase PKR-like ER kinase*), IRE1α (*Inositol-Requiring Enzyme 1α*) und ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) sind im inaktiven Zustand transmembranös an GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78*) gebunden. Bei Akkumulation von ungefaltetem Protein dissoziiert GRP78 und die Proteine werden aktiviert. PERK dimerisiert und autophosphoryliert und führt damit zur Aktivierung und Phosphorylierung von eIF2α (*Eucaryotic Initiation Factor 2α*). Ein genereller Translationsblock wird initiiert. ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) wird verstärkt synthetisiert. Als Transkriptionsfaktor führt er im Nukleus zu verstärkter Synthese von Proteinen des Aminosäuremetabolismus, von Redoxreaktionen und von CHOP (*C/EBP Homologous Protein*). IRE1α dimerisiert und trans-autophosphoryliert. Mit aktivierter RNAase-Aktivität entfernt es ein Intron aus XBP1-mRNA (*X Box Binding Protein 1*) und führt so zu einer *frame-shift*-Variante: zu XBP1s. XBP1s führt als Transkriptionsfaktor zur verstärkten Synthese von Chaperonen, XBP1 und CHOP. ATF6 wird nach Aktivierung im Golgi-Apparat von Proteasen geschnitten. Dabei entsteht ebenfalls ein aktiver Transkriptionsfaktor, welcher die Synthese von Chaperonen, Proteinen der Proteindegradation und P58^{IPK} initiiert.

Quelle: Eigene Abbildung, angelehnt an (Szegezdi et al., 2006)

Der PERK-Signalarm ist die schnellste Reaktion unter ER-Stress-Bedingungen und führt zu einer umfassenden Reduktion der Translation. Nach der Dissoziation von GRP78 kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung von PERK, wodurch dieses aktiviert wird. Aktiviertes PERK phosphoryliert eIF2 α (englisch: *Eukaryotic Initiation Factor 2 α*). Durch die Phosphorylierung kann eIF2 α keine suffiziente Translation mehr initiieren, was eine generelle Inhibition der Proteintranslation zur Folge hat (Harding et al., 1999; Ron, 2002). Nicht alle Proteine sind von diesem Translationsblock betroffen. Paradoxerweise werden manche Proteine durch eIF2 α Phosphorylierung verstärkt synthetisiert. Zu ihnen gehört z.B. ATF4 (englisch: *Activating Transcription Factor 4*) (Scheuner et al., 2001; Han et al., 2013). ATF4 fungiert als Transkriptionsfaktor für ER-Stress-Zielgene (Harding et al., 2003). Zu ihnen zählt auch GADD34 (englisch: *Growth Arrest and DNA Damage-inducible Gene 34*). GADD34 dephosphoryliert eIF2 α und trägt so dazu bei, den Translationsblock wieder aufzuheben (Novoa et al., 2001). Unter verlängerten Stressbedingungen führt die Aktivierung von ATF4 jedoch auch zur Expression von CHOP (englisch: *C/EBP Homologous Protein*), welches stark proapoptotisch wirkt.

Nach Dissoziation von GRP78 kommt es zur Translokation von ATF6 in den Golgi-Apparat (Shen et al., 2002). Im Golgi-Apparat wird ATF6 von den Golgi-residenten Enzymen S1P und S2P (englisch: *site-1 und site-2 Protease*) proteolytisch geschnitten und ein bZIP (englisch: *basic leucine Zipper*) Transkriptionsfaktor freigesetzt (Ye et al., 2000). Im Nukleus bindet ATF6 an ERSE-1 und -2 (englisch: *ER-Stress response elements*) sowie an CRE (englisch: *ATF/cAMP response element*) (Kokame et al., 2001; Wang et al., 2000), was zur einer erhöhten Synthese von Chaperonen z.B. GRP78 und XBP1 (englisch: *X Box Binding Protein 1*) führt. Die Erhöhung der Chaperon Konzentration führt zu einer erhöhten Faltungskapazität des ERs. Damit handelt es sich beim ATF6 Signalweg zunächst vornehmlich um einen antiapoptotischen Signalweg (Szegezdi et al., 2006).

Im letzten der drei Signalwege wird IRE1 α aktiviert. Ebenso wie bei der Aktivierung von PERK dimerisiert und trans-autophosphoryliert auch IRE1 α . Durch die Phosphorylierung wird die Endoribonukleaseaktivität (RNase) von

IRE1 α aktiviert. In seiner Funktion als RNase entfernt IRE1 α ein 26 Nukleotid großes Stück aus der XBP1-mRNA. So entsteht eine *frame shift splice*-Variante von XBP1, XBP1s. XBP1s ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor (Yoshida et al., 2001). Seine Zielgene kodieren z.B. für Chaperone und P58^{IPK}. P58^{IPK} führt durch einen negativen Feedback Mechanismus zur Inhibition von PERK und hebt damit ebenso wie GADD34 den Translationsblock der Zelle wieder auf. Somit führt P58^{IPK} Aktivierung mutmaßlich zur Beendigung des ER-Stresses (Yan et al., 2002). Darüber hinaus prozessiert IRE1 α mit seiner RNase Aktivität nicht nur XBP1, sondern auch andere mRNAs. Dieser Vorgang nennt sich RIDD (englisch: *Regulated IRE Dependent Decay*) und trägt vermutlich zur Verminderung der Proteinlast im ER bei (Hollien et al., 2009).

Unter prolongierten Stressbedingungen werden jedoch zunehmend proapoptotische Signalkaskaden aktiviert. Gelingt es nicht, die Zellhomöostase wiederherzustellen, unterläuft die Zelle der Apoptose.

Wie zuvor beschrieben, kann phosphoryliertes IRE1 α zur Terminierung des ER-Stresses führen. Anhaltend aktiviertes IRE1 α hat jedoch die Fähigkeit TRAF2 (englisch: *TNF-receptor-associated factor-2*) zu binden. TRAF2 ist im Ruhezustand an der ER-assoziierten Caspase 12 gebunden und führt durch Dissoziation zu deren Aktivierung und in Folge zur Apoptose (Yoneda et al., 2001) (siehe Abbildung 3). Des Weiteren aktiviert der IRE1-TRAF2-Komplex ASK1 (englisch: *apoptosis-signal-regulating kinase*) (Nishitoh et al., 2002) und in dessen Folge JNK (englisch: *c-Jun N-terminal kinase*) (Urano et al., 2000). Die JNK-Aktivierung führt ebenfalls zur Apoptose (Yoneda et al., 2001).

Ebenso beteiligt an der Zellapoptose sind die Proteine der BH3- (englisch: *Bcl-2 homology domain* 3) Familie. Üblicherweise befinden sich proapoptotisches Bak/Bax (englisch: *Bcl-2 homologous antagonist/killer / Bcl-2-like proteine* 4) und antiapoptotisches Bcl-2 (englisch: *B-cell lymphoma 2*) im Gleichgewicht. Im PERK-ATF4-Pathway entstandenes CHOP inhibiert die Transkription von antiapoptotischem Bcl-2 (McCullough et al., 2001). Dies hat ein Überwiegen der proapoptotischen Proteine zur Folge. Dimerisiertes Bak/Bax formt Poren in der ER-Membran und es kommt zum Kalzium-Efflux (Bassik et al., 2004; Wei et al., 2000). Hohe zytoplasmatische Kalziumkonzentrationen aktivieren Calpain, was wiederum die Aktivierung von Caspase 12 nach sich zieht (Nakagawa et al.,

2000). Zytoplasmatisches Kalzium wird von den Mitochondrien der Zelle aufgenommen. Normalerweise inhibiert Bcl-2 den Kalzium-Influx, nicht jedoch unter CHOP induzierter Repression. Der mitochondriale Kalziumeinstrom führt zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Caspase 12-unabhängigen Aktivierung von Caspase 3 und somit schlussendlich zur Apoptose (Wei et al., 2000).

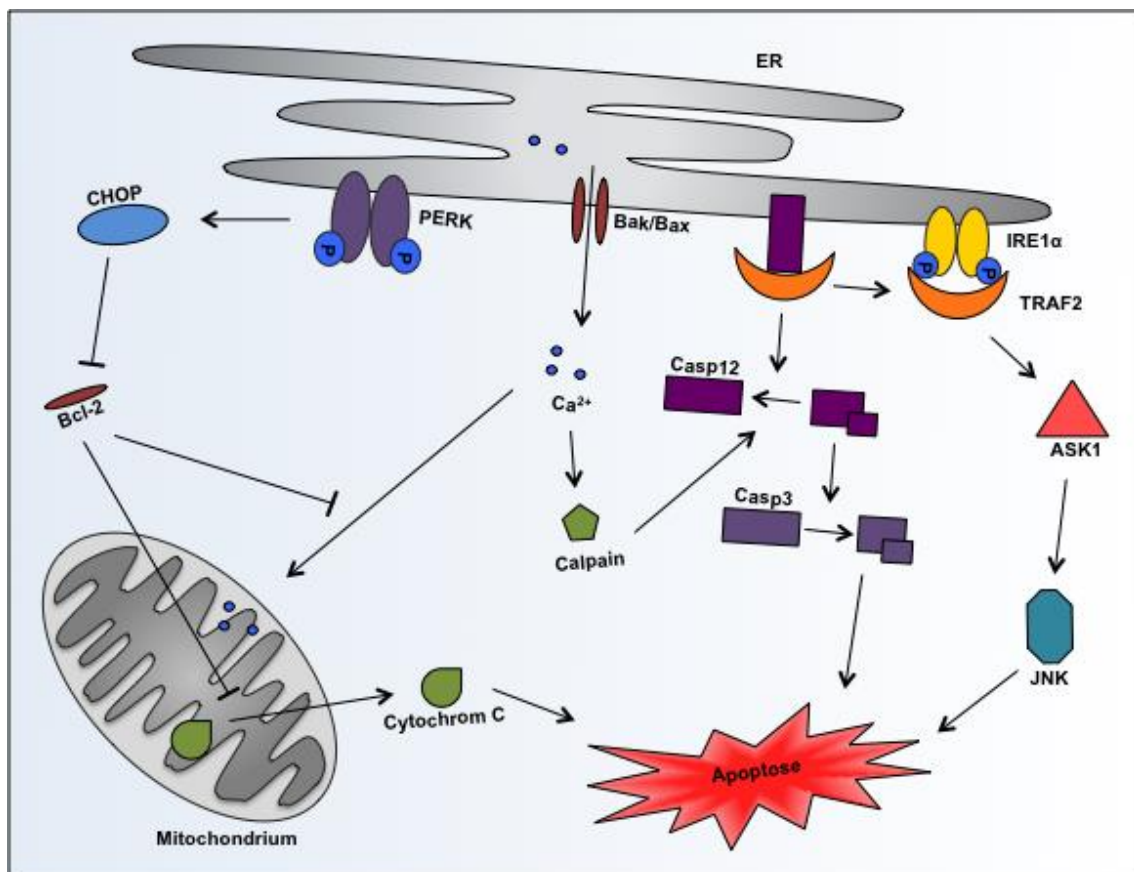


Abbildung 3: ER-Stress assoziierte Apoptose.

Prolongierter ER-Stress führt zu Apoptose. Aktiviertes IRE1α (*Inositol-Requiring Enzyme 1α*) bindet TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*). Dadurch wird ein ASK1- (*apoptosis-signal-regulating kinase*) und JNK- (*c-Jun N-terminal kinase*) abhängiger Apoptoseweg aktiviert. Durch TRAF2-Dissoziation wird Caspase 12 aktiviert. Dieses führt über Caspase 3-Aktivierung zur Apoptose. Durch PERK (*Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*)-Aktivierung kommt es zur Synthese von CHOP (*C/EBP Homologous Protein*). CHOP führt durch Inhibierung von Bcl-2 zu einem Ungleichgewicht zwischen Bak/Bax und Bcl-2. Es kommt zur vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem ER ins Zytosol mit konsekutiver Aktivierung von Calpain welches über Aktivierung von Caspase 12 apoptotisch wirkt. Intrazytoplasmatisches Kalzium wird von Mitochondrien aufgenommen. Dies führt über die Aktivierung und Freisetzung von Cytochrom C zur Apoptose. Bcl-2 inhibiert diesen Prozess, ist jedoch durch CHOP gehemmt.

Quelle: Eigene Darstellung, angelehnt an (Wu et al., 2006)

3.5 ER-Stress in neurodegenerativen Erkrankungen

Gemeinsames pathologisches Merkmal von der AD, PD und auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen ist die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen. Dass die Aggregation von Proteinen zu ER-Stress führen kann, wurde bereits im vorigen Abschnitt erläutert.

Der erste Beweis einer Verbindung zwischen ER-Stress und neurodegenerativen Erkrankungen gelang mit dem Nachweis von Proteinen der UPR-Signalkaskade in *post-mortem* Untersuchungen von Alzheimer- und Parkinson-Patienten. Hoozemans und Kollegen zeigten erhöhte Konzentrationen von pPERK und pelf2 α in hippocampalen Neuronen von AD-Patienten sowie in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* von PD-Patienten im Vergleich zur normalgealterten Kontrollgruppe (Hoozemans et al., 2007; Hoozemans et al., 2009). In ihren histopathologischen Studien gelang ihnen nicht nur eine Verbindung von UPR und PD sowie AD nachzuweisen, sie konnten auch zeigen, dass ER-Stress und UPR ein besonders frühes Ereignis in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen darstellen. Aktivierte UPR-Marker fanden sich nämlich v.a. in jenen Zellen, in denen sich auch diffuse Tau- und α -Synuklein Aggregate fanden und nicht solide Tangles oder Lewy-Körperchen (Hoozemans et al., 2012).

Weitere genetische, Tiermodell und Zellkultur-Modell Studien folgten im Laufe der Jahre, um ein tieferes Verständnis dafür zu erlangen, wie Proteinaggregation, ER-Stress und Nervenzelltod zusammenhängen.

Arbeiten zur Beteiligung von ER-Stress und UPR an der Pathogenese der AD konnten zeigen, dass A β 1-42 als wichtiger Bestandteil der Pathologie und toxisches Oligomer in der Lage ist, ER-Stress und UPR zu induzieren (Resende et al., 2008). Resende und Kollegen gelang der Nachweis, dass A β 1-42 zur Störung der Kalziumhomöostase des ERs führt und GSK3 β (englisch: *Glycogen synthase kinase 3 beta*) -vermittelt die Bildung von NFTs induziert. (Resende et al., 2008). Interessanterweise war auch in den zuvor erwähnten *post-mortem* Untersuchungen in PERK-positiven Neuronen die Konzentration von GSK3 β erhöht (Hoozemans et al., 2009). Zudem konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien durch die Behandlung mit A β eine Induktion verschiedener ER-Stress-Marker induziert werden (Clarke et al., 2015; Lee et al., 2010).

Prolongierte Stressbedingungen führen zur Apoptose. Dies geschieht zum Teil über einen JNK-vermittelten Signalweg. A β 1-42 ist in der Lage JNK zu aktivieren und so zur Apoptose zu führen (Morishima et al., 2001).

In weiteren Arbeiten fanden sich Hinweise, dass A β nicht nur die UPR induziert, sondern eine gestörte UPR-Regulation auch zu einer erhöhten A β -Produktion führt. Zellen mit einer alternativ prozessierten Variante von Presenilin 2 weisen eine verminderte Konzentration an phosphoryliertem IRE1 und GRP78 sowie eine erhöhte Konzentration von A β 1-40 und A β 1-42 auf. In *post mortem* Untersuchungen von AD-Patienten konnte dieser Zusammenhang verifiziert werden (Sato et al., 2001). Auch eine Störung der Kalziumhomöostase gilt als ER-Stress-Induktor. Patienten mit frühen Stadien von AD weisen eine erhöhte Calciumkanaldichte vom Ryanodin Typ auf (Kelliher et al., 1999). Dies führt zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration und damit wahrscheinlich zur gesteigerten Produktion von A β (Querfurth et al., 1997).

Des weiteren fanden sich Hinweise, dass eine Dys- oder Fehlregulation einzelner Signalwege auch eine verfrühte Apoptose zur Folge haben kann, eine intakte UPR also neuroprotektiv sein kann. A β -induzierter ER-Stress führte in PERK-negativen (PERK $^{-/-}$) *Knockout*-Mäusen zu einer signifikanten Apoptose-neigung im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen (Lee et al., 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ER-Stress und UPR in der Pathogenese der AD aktiviert sind und eine wesentliche Rolle in Zellhomöostase und Zelltod spielen. Gestörte Regulationsprozesse oder verlängerte Stressbedingungen können zur Progression der Erkrankung beitragen. Eine wesentliche Rolle des A β ist analog der Hypothese zur Amyloid-Kaskade (siehe Abbildung 1) wahrscheinlich.

α -Synuklein Aggregationen stellen ein wesentliches histopathologisches Merkmal der PD dar. Mutationen im α -Synuklein Gen führen zur autosomal dominanten Form der PD und α -Synuklein Aggregationen können Zelltod induzieren (el-Agnaf et al., 2002). Demnach ist α -Synuklein ein zentraler Bestandteil in der Pathogenese der PD und die Vermutung liegt nahe, dass seine Aggregation zur Induktion von ER-Stress führen kann, wofür sich Hinweise in mehreren Studien fanden.

Hoozemans und Kollegen konnten eine Überexpression von PERK und eIF2 α in der SN von PD-Patienten im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpatienten zeigen. Zudem ließ sich eine räumliche Assoziation der Veränderungen zu α -Synuklein Aggregationen zeigen (Hoozemans et al., 2007).

In weiteren *in vitro* Studien ließ sich ebenfalls ER-Stress induzieren. Cooper und Kollegen führten Studien in Hefen durch und zeigten, dass α -Synuklein zur Störung des vesikulären Proteintransports zwischen ER und Golgi-Apparat und somit zur Proteinakkumulation und Zelltod führt (Cooper et al., 2006). Eine andere Gruppe erhob Daten, wonach α -Synuklein GRP78 bindet und somit die Aktivierung der UPR-Signalkaskade bedingt (Bellucci et al., 2011).

In einem PD-Zellkulturmodell ließ sich durch die Behandlung mit 6-OHDA in PC12-Zellen ebenfalls die Expression von PERK und IRE1 α induzieren (Ryu et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LRRK2 (englisch: *leucine-rich repeat kinase 2*) zytoprotektiv durch Induktion von GRP78 wirkt. Mutationen im LRRK2-Gen führen zur autosomal-dominanten Form der PD (Yuan et al., 2011).

Damit wird deutlich, dass ER-Stress maßgeblich in die Pathogenese der PD involviert ist. α -Synuklein ist als Hauptbestandteil der intrazellulären Proteinaggregate in der Lage, ER-Stress und Nervenzelltod zu induzieren. Da die UPR als frühzeitiges Ereignis vor dem Zelltod auftritt, ist die Modulation der ER-Stresskaskade als therapeutischer Interventionsversuch besonders interessant, um Nervenzellverlust entgegenzuwirken. Eine kausale Therapie wäre damit zwar noch nicht gegeben, vor dem Hintergrund der bisherigen zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten könnte ein solcher Therapieansatz aber auf jeden Fall eine grundlegende Verbesserung darstellen.

3.6 Auswirkung von ER-Stress auf mikrogliale Zellen

Über die Zusammenhänge von ER-Stress und Inflammation, insbesondere zu ER-Stress und UPR in mikroglialen Zellen, ist bislang wenig bekannt. Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass ER-Stress über verschiedene Signalwege Inflammation triggern kann.

So zeigten Pahl und Baeuerle, dass die Akkumulation von Proteinen und ER-Stress über die Aktivierung von NF κ B (englisch: *nuclear factor 'kappa-light-*

chain-enhancer' of activated B-cells) zu einer inflammatorischen Aktivität führt (Pahl et al., 1995). NFκB spielt eine zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor zahlreicher Zytokine und Chemokine und dadurch in der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Die Aktivierung von NFκB geschieht im Rahmen von ER-Stress über den PERK-eIF2α-Signalarm. Der hier induzierte Translationsblock führt zu einem Missverhältnis von NFκB zu IκB (englisch: *Inhibitors of κB*) und somit zu einem relativen Überschuss von NFκB (Deng et al., 2004). Des Weiteren beteiligt ist der IRE1α-Signalweg. Nach Aktivierung kann dieses wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt einen Komplex mit TRAF2 bilden (siehe 3.4). Der IRE1α-TRAF2-Komplex führt über Phosphorylierung von IκB zur Aktivierung von NFκB (Hu et al., 2006). Darüber hinaus wird über Aktivierung von JNK direkt eine inflammatorische Antwort getriggert (Shaulian et al., 2002; Sprenkle et al., 2017; Urano et al., 2000). Auch für eine Beteiligung des IRE1-XBP1-Signalwegs gibt es Hinweise (Miani et al., 2012).

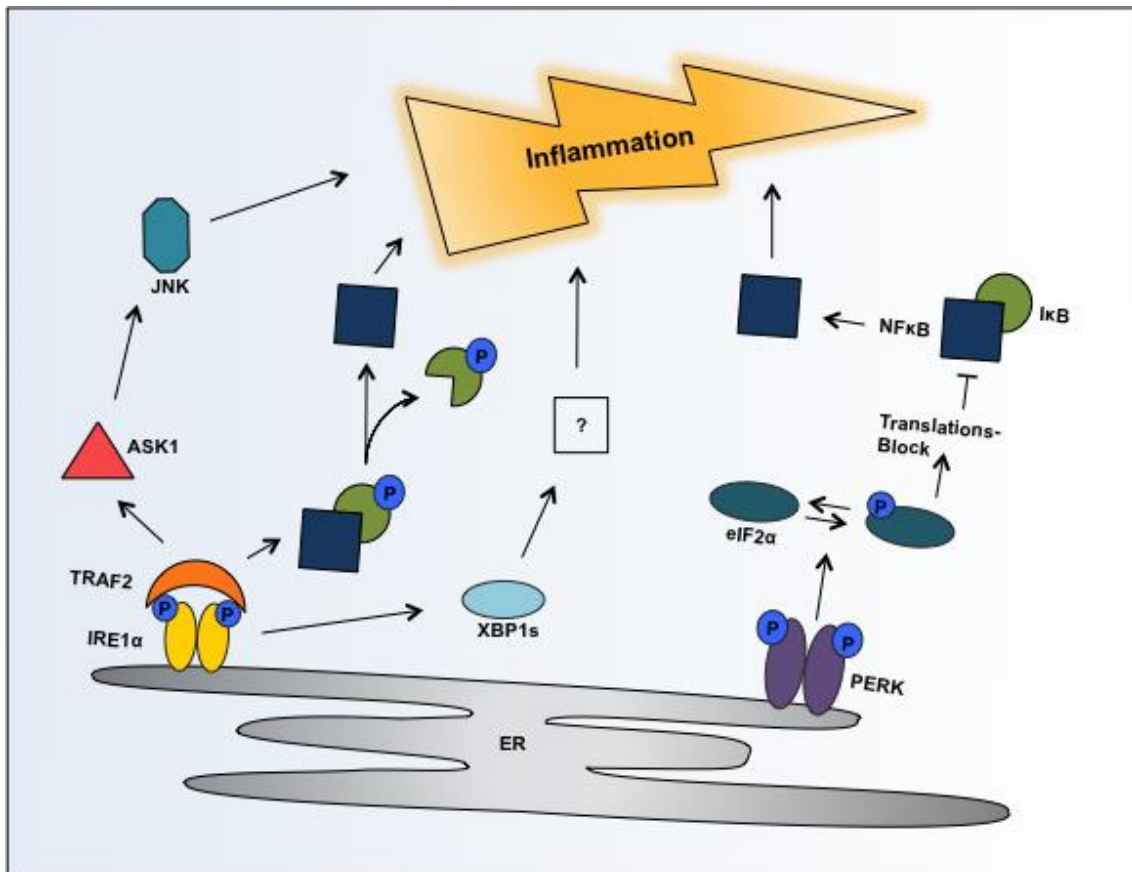


Abbildung 4: ER-Sress induzierte Inflammation.

Diese wird v.a. über NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-vermittelte Signalwege induziert. Der durch PERK (*Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*)/eIF2α (*Eucaryotic Initiation Factor 2α*)-induzierte Translationsblock führt über geringere Halbwertszeiten von IκB (*Inhibitors of κB*) zu einer relativen Aktivierung von NFκB. Ebenso induziert der IRE1α (*Inositol-Requiring Enzyme 1α*)-Signalweg über Phosphorylierung von IκB die Aktivierung von NFκB. Eine direkte inflammatorische Antwort wird JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)-vermittelt über den IRE1α-ASK (*apoptosis-signal-regulating kinase*)-JNK-Komplex induziert. Zudem gibt es Hinweise für eine IRE1α-XBP1s (*X Box Binding Protein 1*) vermittelte inflammatorische Aktivität.

Quelle: Eigene Abbildung, angelehnt an (Sprenkle et al., 2017)

Einige wenige Arbeiten konnten Belege für ER-Stress und UPR in mikroglialen Zellen liefern. In BV2-Zellen, einer murinen mikroglialen Zelllinie (Blasi et al., 1990), konnte durch Exposition mit Kokain die Induktion verschiedener Proteine der UPR-Signalkaskade induziert werden (Costa et al., 2013). Auch konnten in mikroglialen Zellen um inflammatorische Läsionen herum von Enzephalomyelitis Disseminata (ED)-Patienten verschiedene ER-Stress-Proteine nachgewiesen werden (Mhaille et al., 2008). Hierbei handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung mit aktivierten Mikrogliazellen.

Durch Nachweis einer Aktivierung neuroinflammatorischer Signalkaskaden infolge ER-Stress ist dieser nicht nur direkt in neuronalen Zelluntergang involviert, sondern auch indirekt im Rahmen von Neuroinflammation an einer zusätzlichen Neurotoxizität beteiligt. Der Nachweis von ER-Stress in aktivierten Mikrogliazellen unterstreicht diese These. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von ER-Stress an der Apoptose von mikroglialen Zellen gezeigt werden. So korreliert NO-induzierte Toxizität in Mikroglia mit erhöhten Konzentrationen an CHOP (Kawahara et al., 2001).

3.7 Alzheimer- und Parkinson-Zellkulturmodelle

Um mehr Erkenntnisse von denen sich im Menschen abspielenden Vorgängen zu bekommen, ist man versucht Modelle zu entwickeln, welche den neurodegenerativen Prozessen in AD- und PD-Patienten so nahe wie möglich kommen. Die Verwendung von *in vitro* Zellkulturmodellen ist eine beliebte Methode zur Simulation von physiologischen und pathologischen Prozessen auf zellulärer Ebene. Im Folgenden werden zwei etablierte Zellkulturmodelle für die AD und PD kurz vorgestellt, die in der Arbeit später aufgenommen werden.

Um die neurodegenerativen Prozesse der AD zu simulieren, wird ein Amyloid-beta1-42-Zellkulturmodell verwendet. A β 1-42 ist Hauptbestandteil der extrazellulären Amyloid Plaques. Wie zuvor erläutert, wirkt es toxisch auf neuronale Zellen und kann zur Aktivierung von Mikroglia führen. Viele Experten sehen in der Aggregation von fehlgefaltetem Amyloid-beta den Ursprung der neurodegenerativen Prozesse der AD (siehe Abbildung 1). Mit seiner Wirkung auf Neurone und Mikroglia hat sich die Anwendung von A β 1-42 in AD-Modellen bewährt (Chong et al., 2006; Gold et al., 2013).

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein strukturelles Katecholamin- und Dopaminanalogon (Simola et al., 2007). Als dieses wird es über spezifische Noradrenalin- und Dopamintransporter (NAT, DAT) in die Zelle aufgenommen (Van Kampen et al., 2000). Wird 6-OHDA intrazellulär von der Monoaminoxidase (MAO) abgebaut, einem Enzym welches für den Abbau von Katecholaminen zuständig ist, entsteht Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Wasserstoffperoxid induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species* (ROS)) und die Zelle ist oxidativem Stress ausgesetzt. Dieser führt schluss-

endlich zum Zelltod (Cohen, 1984; Radi et al., 2014). Damit hat sich das 6-OHDA-Zellkulturmodell als weitläufig verwendetes PD-Modell durchgesetzt.

3.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, UPR und ER-Stress in bestehenden Alzheimer- und Parkinson-Zellkulturmodellen zu untersuchen. Verwendet werden die zuvor erläuterten A β 1-42- und 6-OHDA-Schädigungsmodelle an murinen primären kortikalen Neuronen und mesenzephalen Mikrogliazellen.

Des Weiteren sollen die Auswirkungen von A β 1-42 und 6-OHDA auf die Aktivierung und die Regulation von ER-Stress untersucht werden. Zu diesem Zweck werden UPR-Zielproteine und Apoptosemarker bestimmt, die an verschiedenen Zeitpunkten aktiv sind und sich in ihren Funktionen und ihrer Bedeutung für das Zellüberleben unterscheiden. Bestimmt werden Proteinexpression von GRP78, ATF6, CHOP und Caspase 3. Die Auswahl der verschiedenen ER-Stress-Proteine erfolgte nach folgenden Kriterien:

GRP78 ist ein hochkonserviertes Protein aus der Familie der *Heat Shock* Proteine (Lee, 2001). Lokalisiert im Lumen des ERs fungiert es als Chaperon und trägt zur Faltungskapazität des ERs bei. Nach neueren Erkenntnissen hält GRP78 auch eine Funktion als membrangebundener Rezeptor für ein großes Spektrum an Liganden inne, z.B. Autoantikörper, Plasminogen und Makroglobulin und ist beteiligt an viralen Infektionen (Gonzalez-Gronow et al., 2009). Im Rahmen der UPR wird seine Expression v.a. über den IRE/XBP1 Signalarm reguliert (Lee et al., 2003) und wirkt in seiner Funktion als Chaperon v.a. antiapoptotisch. Diverse Arbeiten belegen eine Aktivierung von GRP78 im Rahmen von ER-Stress (Chen et al., 2004). Damit hat sich GRP78 zum einen als praktikables Markerprotein der UPR etabliert, zum anderen eignet es sich zur Überprüfung des IRE1/XBP1 Signalarmes.

ATF6 gehört zur *ATF/CREB* (englisch: *basic-leucine zipper (bZIP) DNA binding*) Proteinfamilie. Nach Aktivierung wird es von Golgi-residenten Proteasen geschnitten und ist danach aktiver Transkriptionsfaktor (Ye et al., 2000).

Es stellt das Ausgangsprotein eines weiteren Signalarms dar. Daher erfolgten die Bestimmung der ungeschnittenen sowie der geschnittenen Form und die Evaluation der zeitlichen Entwicklung der Proteinexpressionslevel.

Die Induktion von CHOP geschieht v.a. über den PERK/eIF2 α Signalarm. CHOP hat hauptsächlich proapoptotische Funktionen und seine Expression markiert den Scheidepunkt der Zelle hin zur Apoptose (Szegezdi et al., 2006). Gleichzeitig ist CHOP ein äußerst sensibler Parameter für ER-Stress-Bedingungen (Zinszner et al., 1998; Li et al., 2014). CHOP repräsentiert damit ein gut messbares Protein der UPR zu einem Zeitpunkt, der ein zunehmendes Scheitern kompensatorischer Mechanismen markiert und bietet sich exemplarisch zur Überprüfung des dritten Signalarms an.

Die Aktivierung von Caspasen führt zu Zelltod. Es gibt eine Reihe von Caspasen, die mit ER-Stress assoziiert sind. Dazu zählen Caspase 3, 6, 7, 8, 9, und 12 (Szegezdi et al., 2006). Caspase 3 dient an dieser Stelle als Apoptosemarker. Unter Aktivierung wird die inaktive Form geschnitten. Dieser Vorgang ist nicht ER-spezifisch, jedoch kann man bei Nachweis der geschnittenen Form Aussagen über den Zustand der Zellen und indirekt über ER-Stress und UPR, bzw. deren Erfolg in der Wiederherstellung homöostatischer Bedingungen in den Zellen treffen.

Zunächst soll mithilfe von zwei verschiedenen Toxizitätsassays (MTT-Assay und Doppelfärbung) die jeweilige Konzentration von A β 1-42 sowie 6-OHDA gefunden werden, welche eine geeignete Schädigung in den Zellen hervorruft. Gesucht wird eine milde Schädigung, welche eine Viabilitätsreduktion von ca. 30-50% hervorruft. Die Einschränkung der Viabilität ist dabei stärker zu gewichten als eine Reduktion der Zellzahl, da zu erwarten ist, dass ER-Stress und in Folge UPR aktiv sind, bevor es zur Apoptose kommt.

Anschließend soll mithilfe der zuvor ermittelten Konzentrationen eine Schädigung induziert werden und die Expression der festgelegten Proteine im Western Blot bestimmt werden. Die ermittelten Zeitpunkte der optimalen Schädigung werden ggf. in diesen Experimenten aus oben aufgeführten Gründen um

frühere präklinische Schädigungszeitpunkte ergänzt, um einen optimalen Einblick in die UPR-Regulation zu erhalten.

Die genauen Fragestellungen, welche im Verlauf dieser Arbeit beleuchtet werden sollen, sind:

1. Können A β 1-42 und 6-OHDA in den verwendeten Schädigungsmodellen potent ER-Stress induzieren?
2. Welche Signalarmede werden durch die verwendeten Substanzen aktiviert und in welchem zeitlichen Zusammenhang stehen einzelne Stressproteine zueinander?
3. Kann ER-Stress auch in mikroglialen Zellen induziert werden und gibt es einen Zusammenhang zur inflammatorischen Aktivität der Zellen?

4 Material

Tabelle 1:Geräte

Gerät	Bezugsquelle
CO ₂ Inkubator CB210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Elektrische Multipette Research Pro, 300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA-Reader Infinite 200 series	Tecan Deutschland GmbH, Crailshaim, Deutschland
ELISA-Washer Biotrak 2	Amersham Biosciences, Cambridge, England
Entwicklerkassette Quanta Fast Detail	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Feinwaage ME 235S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese- und Transfersystem XCell Sure Lock	Invitrogen Life Technologie GmbH, Carlsbad, USA
Heizblock PCH-2	Grant Instruments Ltd., Shepreth, England
Heiz-Magnetrührer MR Hei-Tec	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Inkubator Funktion Line	Heraeus, Instrument, Osterode, Deutschland
Mikroskop Eclipse TE2000-E	Nikon, Tokio, Japan
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer Blaurand	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
pH Meter MP220	Mettler, Toledo, Spanien
Pipettboy	Integra Biosciences, St Ouen l'Aumône, Frankreich
Pipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Pac Universal Power supply	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Kelheim, Deutschland

Sterilbank hera safe	Thermo scientific, Langenselbold, Deutschland
Vakuumpumpe Vario Air	Drägerwerk AG & Co. KG., Lübeck, Deutschland
Vortex Schüttler 444-1372	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad WB10	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden, Deutschland
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus Instrument, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Cell Scraper 25cm	Sarstedt, Newton, USA
Combitips Plus 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA-Platten, Mikrolon, 96K, U-Form, hohe Bindungskapazität	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcons 15ml, 50ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Fertiggel, NuPage, 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Low binding Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Mircrocapillary Tipps 200µl	VWR, West Chester, USA
Nitrilhandschuhe Unigloves Format Parafilm	Unigloves, Troisdorf, Deutschland
Pasteurpipetten Glas 230mm	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten 20, 200,300, 1000µl	Brand GmbH & CoKG, Wertheim, Deutschland
Protein LoBind Tube 2ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Protan Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotilabo-Blottingpapier	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 48, 96 well	Greiner Bio-One GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Amyloid-beta 1-42	PSL, Heidelberg, Deutschland
Borax	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dihydrogensulfat, Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland
1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl) 37%, rauchend	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na-deoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-(1-Naphthyl)-ehtylendiamin-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PEI (Polyethylenimine)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Kits und Lösungen

Kit, Lösung	Bezugsquelle
Dulbecco`s PBS (1x) with/without Ca & Mg	PAA, Pasching, Österreich
Entwicklerlösungen	Agfa-Gevaert, Mortsch, Belgien
Mem Code Reversible Protein Stain Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
NuPage Antioxidant	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA

NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Reagent Diluent (10x)	R&D Systems, Minneapolis, USA
RotiBlock	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis, USA
Super Signal west Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
See Blue Plus2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
TMB Soluble	Calbiochem, San Diego, USA

Tabelle 5: Medien und Zusätze

Medium, Zusatz	Bezugsquelle
Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Paschin, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Paschin, Österreich
L-Glutamin	BioWhittaker, Lonza, Veriers, Belgien
Penicillin / Streptomycin	BioWhittaker, Lonza, Veriers, Belgien

Pufferlösungen

PBS (englisch: *Phosphate buffered saline*), **10-fach, pH7,4**

- NaCl (80 g/L)
- KCL (2 g/L)
- Na₂HPO₄ wasserfrei (14,4 g/L)
- KH₂PO₄ (2,4 g/L)

TBST (englisch: *Tris buffered saline with Tween*)

- PBS 1fach
- Tween (0,5 ml/L)

Lysepuffer

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 1% Triton-X-100
- 0,5% Na-deoxycholat
- 1 mM PMSF

Polyethylenimine (PEI)

14,4 g Borax
800 ml Wasser pH 8,3
4 g 50% PEI
auf einen Liter auffüllen

Griess Reagenz 1

- Sulfanilamid (1% in 5% H_3PO_4)

Griess Reagenz 2

- N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (0,1%)

Stopp-Lösung ELISA: 2N Schwefelsäure (5%)

- H_2SO_4 , rauchend (50 ml/L)

Eraser MemCode

- 1L ddH₂O
- 7,8 ml Salzsäure, rauchend

Stripping buffer

0,2 M NaOH

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
ATF6, ab37149	abcam, Cambridge, England
XBP1, sc-7160	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
ATF4, SAB2105294-50UG	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
GADD 153, sc-575	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Caspase 3, #9665	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
GRP78, sc-1051	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Vinculin, V9264	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked, #7074S	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Anti-Mouse IgG, HRP-linked, #7076S	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Donkey-anti-goat, sc2020	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland

5 Methoden

5.1 Zellkultivierung

Jegliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank und mit sterilen Gebrauchsgegenständen durchgeführt. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO₂-Luftanteil. Der Zustand der Kulturen wurde regelmäßig im Mikroskop überprüft.

Alle Versuche erfolgten unter Durchführung einer Lösemittelkontrolle und einer Positivkontrolle. Als Lösemittelkontrolle wurde das Lösemittel der entsprechenden Substanz unter gleichen Bedingungen wie die zu testende Substanz verwendet. Alterungsschritte, Zentrifugation etc. wurden gleichermaßen vorgenommen.

In der Vorbereitung wurden 24 Stunden vor Präparation sterile Zellkulturplatten mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet und bei 37°C inkubiert. Dies führt zu einer positiven Ladung des Bodens, wodurch es zur Adhäsion der negativ geladenen Zellmembranen kommt. Anschließend wurden die Platten viermal mit PBS gewaschen.

Verwendet wurden murine primäre kortikale Neurone sowie murine primäre mesenzephalische Mikroglia. Zur Zellgewinnung wurden trächtige Swiss Webster (CFW) Mäuse an Schwangerschaftstag 13-14 durch zervikale Dislokation von einer autorisierten Person getötet und deren Embryos entnommen. Für die Neuronenkultur wurden deren Kortizes entnommen und für die Mikroglia Kultur deren Mesenzephalien. Die entnommenen Gehirne wurden für diesen Schritt von ihren Meningen befreit und in einem Verhältnis von 8-12 Gehirnen/2 ml in Leibovitz-L15 Präparationsmedium überführt. Zur Herstellung einer Suspension wurden die Gehirnlösungen 20-30 Mal mit einer 1000 µl Pipette mit einem eingestellten Volumen von 850 µl aspiriert und auf 7 ml L15 aufgefüllt. Die Suspensionen wurden 10 min ruhen gelassen, damit sich größere Zellverbände als Sediment absetzen. Die Überstände wurden abgenommen und 5 min bei 300 g zentrifugiert.

Für die Kultivierung der neuronalen Zellen wurde das entstandene Zellpellet mit einer Glaspipette vorsichtig in 1 ml vorgewärmten Nährmedium resuspendiert, und auf 10 ml aufgefüllt sowie durch einen Zellsieb gegeben, um verbliebene Gewebestrukturen und Zellverbände herauszufiltern und eine Einzel-Zell-Sus-

pension zu erhalten. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in einer Konzentration von 900.000 Zellen/ml auf den vorbereiteten Platten ausgesät.

Die Inkubation erfolgte für 4-5 Tage, bevor die Zellen für Versuche verwendet werden konnten.

Für die Kultivierung der mikroglialen Zellen wurde das entstandene Zellpellet in 1 ml vorgewärmten Nährmedium resuspendiert und mit dem gewünschten Volumen Nährmedium aufgefüllt.

Ausgesät wurden die Zellen in 6 Well Platten in einer Konzentration von 2 Gehirnen/Well und bei 37°C kultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgte nach 48 Std., sowie nach 7 Tagen. 700 µl altes Medium wurden durch 1 ml neues ersetzt, um Verluste durch Evaporisation auszugleichen. Das frische Medium an Tag 7 wurde mit 10 ng/ml GM-CSF (englisch: *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) versetzt, welches das Mikrogliawachstum anregt.

Für Versuche verwendet wurden Mikroglia am Tag 14-15. 24 Stunden zuvor wurden diese erneut ausgesät, um verbliebene Astrozyten von Mikrogliazellen zu separieren. Dafür wurden Zellkulturplatten, wie beschrieben, vorbereitet und Nährmedium vorgewärmt. Das alte Medium wurde durch frisches Medium ersetzt und die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, bevor sie erneut ausplattiert wurden.

5.2 Amyloid-beta 1-42 Lösung und Alterung

Alle Arbeiten mit Aβ1-42 erfolgten unter einer Sterilbank mit sterilen Materialien und Gerätschaften.

Lyophilisiertes Aβ1-42 wurde auf Raumtemperatur gebracht und in 330 µl 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) gelöst. Je 30 µl Lösung enthielten 100 µg Aβ und wurden in ein *Low-bind* Reagiergefäß überführt. In einer Vakuumzentrifuge wurden die geöffneten Gefäße 30-60 min zentrifugiert bis zur vollständigen Evaporisation des HFIPs. Die Reagiergefäße wurden bei -20°C gelagert.

Zur Oligomerisierung von Amyloid-beta wurde ein Verfahren in Anlehnung an das Protokoll nach Kaye gewählt (Gold et al., 2013; Kaye et al., 2003).

100 μ M A β 1-42 wurden in 120 μ l doppelt destilliertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur in einem *Low-bind* Reagiergefäß für 48 Stunden bei 1400 rpm gerührt. Der Deckel wurde mit mehreren Löchern versehen, um eine vollständige Evaporisation des HFIPs zu gewährleisten. Eine Volumendifferenz durch ebenfalls evaporisiertes Wasser wurde anschließend bis auf 100 μ l wieder aufgefüllt. Die Konzentration der Lösung betrug nun 1 mg/ml = 232 μ M. Die Bildung höhergradiger Oligomere mit einem Molekulargewicht über 100 kDa wurde stichprobenartig in Silbergelen überprüft (Mengel et al., 2013). Gleichsam behandelt wurde ein *Low-bind* Gefäß ausschließlich mit Lösemittel gefüllt, welches bei anschließenden Versuchen als Kontrolle diente.

5.3 6-Hydroxydopamin-Lösung und -Aliquotierung

Unter einer Sterilbank und unter Verwendung steriler Materialien wurde 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) nach Herstellerhinweisen in 1 ml PBS gelöst. Aliquots à 30 μ l wurden bei -80°C gelagert.

Alle Arbeiten erfolgten in einem abgedunkelten Raum und auf Eis, um eine frühzeitige Oxidation von 6-OHDA zu vermeiden.

5.4 Toxizitätsassays

5.4.1 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT- Assays (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) können Aussagen über die Viabilität der Zellen getroffen werden. Nährmedium wurde im Inkubator auf 37°C erwärmt. Anschließend wurde gelbes Tetrazoliumsalz (MTT) darin in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst. Das alte Nährmedium wurde mit einer Eppendorfpipette abgenommen und durch MTT-haltiges Nährmedium ersetzt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dehydrogenasen von stoffwechselaktiven Zellen wandeln diesen wasserlöslichen Farbstoff in den wasserunlöslichen blauen Farbstoff Formazan um. Nach Ablauf der Stunde wurde das Medium erneut abgenommen und der neuentstandene in den Zellen enthaltene Farbstoff durch Zugabe von 200 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) freigesetzt. Die Farbstoffkonzentration wurde anschließend photometrisch bei 570 nm bestimmt. Die gemessene Absorption

verhält sich proportional zur Menge des produzierten Farbstoffs. Die Farbstoffkonzentration hat Aussagekraft über den Zellstoffwechsel und damit indirekt über die Zellvitalität (van Meerloo et al., 2011).

5.4.2 Doppelfärbung

Im Gegensatz zum MTT-Assay handelt es sich hierbei um ein direktes Verfahren zur Bestimmung der Zellvitalität. Tote und vitale Zellen werden mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt und später im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

1 ml PBS wurde mit 15 µl Fluoreszeinacetat (FDA) und 2 µl Propidiumiodid (PI) vermischt und in einem Verhältnis von 1:10 in das Nährmedium der Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C 5 min inkubiert. FDA gelangt in die Zellen und wird von stoffwechselaktiven Zellen in einen grün fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt. PI kann nur durch die Zellmembranen toter Zellen permeieren und interkaliert mit deren DNA, wodurch ein rotes Fluoreszenzsignal entsteht. Nach Ablauf der 5 min wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl PBS ersetzt. Bei jedem Versuch wurden 2 Wells identisch behandelt. Pro Well wurden vier Fotos an den immer gleichen Stellen im Well mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon eclipse TE2000-E) aufgenommen. Zur Vergleichbarkeit sind eine exakte Zeiteinhaltung sowie die Festlegung des Fotoausschnittes sehr wichtig. Da die Farbstoffe sehr lichtempfindlich sind, wurde ausschließlich im Dunkeln gearbeitet.

Durch die anschließende manuelle Auszählung und Bildung eines Durchschnittswertes lässt sich die Zellvitalität nach verschiedenen Behandlungen vergleichen.

5.5 Aktivitätsassays für mikrogliale Zellen

5.5.1 Zytokin-ELISA

Der ELISA (englisch: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist ein quantitatives Nachweisverfahren für die im mikroglialen Nährmedium enthaltenen Zytokine (Engvall et al., 1971).

Der Nachweis der Zytokine erfolgte aus den Überständen der Nährmedien, welches auf Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) untersucht wurde. Es erfolgte eine Kontrolle sowie eine Positivkontrolle bestehend aus dem Medium von 1 μ g/ml Lipopolysaccharide (LPS)-behandelter Zellen für 24 Stunden.

Bei dem Verfahren handelt es sich um eine Sandwich-ELISA-Technik, bei welcher ein Komplex aus Antikörper, Protein, Antikörper gebildet wird. Hierfür wurde zunächst eine ELISA-Platte über Nacht mit einem Primär-Antikörper beschichtet, dem so genannten *Capture* Antikörper, der spezifisch an das Epitop des jeweiligen Zytokins bindet, welches als Antigen fungiert. Die *Capture* Antikörper wurden zum Beschichten nach Herstellerangaben in PBS verdünnt. Die Platten wurden dreimal gewaschen. Um unspezifische Bindungen weitestgehend zu verhindern, wurden die Platten über Nacht mit 200 μ l Superblock/Well bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurden Standard und Proben in Duplikaten aufgetragen. Pro Well wurden je 50 μ l geladen. Ein Leerwert zur Detektion noch bestehender unspezifischer Bindungen wurde ebenfalls aufgetragen und später von den anderen Messungen abgezogen. Die Platten wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Waschen der Platten wurde der Detektions-Antikörper in 1x *Reagent Diluent* nach Herstellerangaben verdünnt aufgetragen und die Platten für 2 Stunden inkubiert. Der Detektions Antikörper bindet ebenfalls spezifisch an ein Epitop der Zytokine, welches sich jedoch von dem Epitop des *Capture* Antikörpers unterscheidet. *Capture* und Detektions Antikörper wurden in 10 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

In die gewaschenen Platten wurden pro Well 50 μ l Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase, englisch: *horseradish peroxidase*) in 1x *Reagent Diluent* nach Herstellerangaben verdünnt geladen und 20 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Ohne erneutes Waschen werden pro Well 50 μ l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) dazugegeben und weitere 20 min dunkel inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 25 μ l einer 5%igen Schwefelsäure abgestoppt. Bei Streptavidin-HRP handelt es sich um ein Enzym, welches an vorhandene Antigen-Antikörper-Komplexe bindet. TMB dient als Substrat und wird in einen blauen Farbstoff umwandelt. Durch Zugabe von Schwefelsäure

kommt es zu einem gelben Farbumschlag, welcher photometrisch gemessen werden kann. Die Intensität des Farbstoffs korreliert mit der Menge des im Nährmedium enthaltenen Zytokins.

5.5.2 Griess-Assay

Beim Griess-Assay handelt es sich um ein Nachweisverfahren für Nitrit. Aktivierte Mikroglia setzen Stickstoffmonoxid frei, dessen stabile Form im Nährmedium Nitrit darstellt.

In eine 96 Well Zellkulturplatte wurden je Well 50 µl Nitritstandard oder Nährmedium aufgetragen. Anschließend wurde je 50 µl Reagenz 1 dazugegeben. Bei Raumtemperatur wurde die Platte 10 min abgedunkelt inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden je 50 µl Reagenz 2 dazugegeben und die Platte weitere 10 min im Dunkeln inkubiert.

Bei Anwesenheit von Nitrit im Medium bildet sich ein roter Azofarbstoff, dessen Absorption nun photometrisch bei 550 nm gemessen werden konnte. Die Intensität des Farbstoffs korreliert mit der Menge des Nitrits im Medium, welche sich durch Kenntnis der Nitritkonzentration im Standard berechnen lässt (Bratton et al., 1939).

5.6 Bestimmung definierter ER-Stress-Proteine

5.6.1 Proteinlysierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Herstellung der Proteinlysate wurde vorbereiteter, bei 4°C gelagerter Lysatpuffer mit 10 µl/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt und anschließend auf Eis gestellt. Den Zellen, ebenfalls auf Eis, wurde sorgfältig das Nährmedium entnommen und durch 50 µl eiskaltes Lysatpuffer-PMSF-Gemisch ersetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden gelöst und in Reagiergefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff gefroren und auf Eis langsam wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bevor die Lysate in einer Kühlzentrifuge bei +4°C und 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurden. Durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen werden auch intrazelluläre Membranen gebrochen und Proteine, die im ER oder im Nukleus lokalisiert sind, werden freigesetzt. Die Überstände

nach Zentrifugation wurden in neue Reagiergefäße überführt und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein photometrisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Nach Herstellerangaben wurde eine Standardreihe aus BSA (englisch: *bovine serum albumin*) in Lysatpuffer hergestellt. Die Lysate wurden 1:10 in Lysatpuffer verdünnt und ebenso wie der Standard auf Eis gelagert. In eine 96 Well Zellkulturplatte wurden nun je 10 µl Verdünnung pro Well pipettiert und mit 90 µl einer 1:50 Mischung der Kitbestandteile aufgefüllt. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 570 nm bestimmt. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Ein Leerwert wurde bestimmt und von den gemessenen Absorptionen subtrahiert.

Die Absorption verhält sich proportional zur Proteinkonzentration der Lysate.

5.6.2 SDS PAGE

Das Verfahren der SDS PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) ist eine biochemische Methode zur Auftrennung eines Proteingemisches entlang eines elektrischen Gradienten anhand der Größe der Proteine (Laemmli, 1970).

In der Vorbereitung wurden die Proben mit Probenpuffer (1/4 des Endvolumens) sowie Dithiothreitol (DTT) (1/10 des Endvolumens) versetzt und anschließend 7 min auf 95°C erhitzt. Durch Erhitzen und Zugabe des reduzierenden DTTs werden Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen. Im Probenpuffer sind außerdem Farbstoff und SDS enthalten. Das SDS bindet äquimolar an die Proteine und führt zu einer gleichmäßigen negativen Ladung und Linearisierung der Proteine. Mithilfe des Farbstoffs kann die laufende Probe im Gel beobachtet werden.

Das im Gel enthaltene Polyacrylamid verleiht dem Gel eine maschennetzartige Struktur. Nach Anlegen einer Spannung an das Gel wandern die denaturierten und negativ geladenen Proteine durch das Gel, wobei kleine Proteine die Netzstruktur schneller durchdringen und weiter wandern als große Proteine.

Verwendet wurden kommerziell erhältliche NuPage Gele von Invitrogen, sowie ein *TankBlot* Gelelektrophorese- und Transfersystem XCell Sure Lock. Als Größenmarker wurde See Blue Plus2 Prestained Standard verwendet. Nach Auftragen der Proben auf das Gel erfolgte die Auftrennung bei 200 V für 35 min in Laufpuffer.

5.6.3 Western Blot

Mittels des *Western Blots* gelingt der Nachweis einzelner Proteine in den durch SDS PAGE aufgetrennten Proteinlysaten.

Bei diesem Verfahren werden die Proteine in einem elektrischen Feld, welches senkrecht zur Laufrichtung der Proteine im Gel steht, vom Agarosegel auf eine Membran übertragen. Anschließend wird die Membran mit einem Antikörper behandelt, welcher spezifisch das gesuchte Protein bindet (Burnette, 1981). Ein zweiter Antikörper bindet den Erstantikörper und dient durch ein gekoppeltes Enzym wie beim Zytokin-ELISA der Detektion bei gleichzeitiger Signalverstärkung.

Zum Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden zunächst Schwämme, Filterpapier und Membran ca. 15 min in Transferpuffer getränkt. Zusammen mit dem Agarosegel wurde alles unter Vermeidung von Luftblasen wie folgt gestapelt: Von Anode zu Kathode 3 Schwämme, Filterpapier, Agarosegel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, 3 Schwämme. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für eine Stunde.

Ob der Transfer erfolgreich war, wurde anschließend mittels Mem Code überprüft bevor die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit 5%iger Milch in TBST (englisch: *Tris buffered saline with Tween*) geblockt wurde. Milchproteine blockieren freie unspezifische Bindungsstellen auf der Membran und ermöglichen so eine spezifische Bindung des Erstantikörpers an das gesuchte Protein. Der Erstantikörper wurde ebenfalls in 5%iger Milchlösung verdünnt und die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

Der Zweitantikörper wurde in 1x RotiBlock verdünnt und die Membran entsprechend dem Erstantikörper für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal 10 min gewaschen.

Da mehrere Zweitantikörper an die Fc-Region des Erstantikörpers binden können, kommt es zur Signalverstärkung. Gekoppelt an den Zweitantikörper ist Meerrettichperoxidase HRP, welche das Substrat, ein Luminol (Super Signal west Dura Extended Duration Substrate), in seine oxidierte Form überführt. Die Inkubation mit Substrat erfolgte für 3 min. Die entstehende Chemolumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Der Film wurde manuell zwischen 2 min und einer Stunde aufgelegt und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Das Mem Code Verfahren lässt sich sinnvoll mit dem des Western Blots verbinden. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran können die auf die Membran geblotteten Proteine sichtbar gemacht werden (Antharavally et al, 2004). Mit diesem Schritt kann kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war. Darüber hinaus wurde der angefärbte Zustand der Membran genutzt, um sie zu schneiden und so den Antikörper-Einsatz zu verringern.

Auf der Membran befindliche Proteine können durch vorsichtiges Schwenken in einer *Stain*-Lösung sichtbar gemacht werden. Entfärbt wird die Membran durch Waschen in einer *Destain*-Lösung.

Verwendet wurde das Mem Code Reversible Protein Stain Kit (Thermo Fisher Scientific). Die Membran wurde genau nach Herstellerhinweisen behandelt.

5.7 Kontrollen

Alle Versuche erfolgten unter Durchführung einer Lösemittel- und einer Positivkontrolle.

In den Versuchen mit 6-OHDA wurde als Lösemittelkontrolle PBS in äquimolaren Mengen verwendet. A β 1-42 wurde in destilliertem Wasser gelöst. Als Lösemittelkontrolle wurde gleichsam behandeltes destilliertes Wasser verwendet.

Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, welche mit 2 μ M Thapsigargin für 24 Stunden behandelt wurden. Thapsigargin ist ein bekannter ER-Stress-Induktor. Durch Inhibition endoplasmatischer Kationen-ATPasen führt es zur Er-

höhung des intrazellulären Kalziums (Lytton et al., 1991) und zu ER-Stress (Kamiya et al., 2013).

5.8 Statistische Auswertung

Zur Beantwortung der zuvor definierten Fragestellung wurde ein statistisches Testverfahren gesucht, mit welchem der Zusammenhang zwischen verwendeter Schädigungskonzentration und Proteinkonzentration möglichst genau berechnet werden kann. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden daher einfaktorielle ANOVA durchgeführt, als unabhängige Einflussvariable wurden die verwendeten 6-OHDA- oder A β 1-42-Konzentrationen definiert. Zuvor wurden die Voraussetzungen zur Durchführung einer ANOVA, Normalverteilung der Werte sowie Homoskedastizität der Varianzen, geprüft. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test und zur Prüfung der Homoskedastizität der Levene-Test angewendet. Bei fehlender Voraussetzung wurde auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Im Fall von mehr Stichproben-Vergleichen wurde der Kruskal-Wallis-Test und im Fall von zwei Stichproben-Vergleichen der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Bei Erfüllung aller Voraussetzungen erfolgte die Berechnung mit einfaktorieller ANOVA. Hier wurde im Fall von mehr als zwei Stichproben-Vergleichen als Post-Hoc-Test die Bonferroni-Korrektur angewandt, verglichen wurde zur unbehandelten Kontrollgruppe. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ angenommen. Für die Berechnung wurde IBM SPSS Statistics 20 benutzt sowie Microsoft Excel 2013.

6 Ergebnisse

6.1 Das neuronale 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell

6.1.1 Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung

Primäre murine kortikale Neurone wurden für 24 Stunden mit 10 μ M, 40 μ M und 100 μ M 6-OHDA behandelt (n=6). Für jede Konzentration zeigte sich eine signifikante Reduktion der Viabilität. (10 μ M: 84%, p = 0,004; 40 μ M: 52%, p = 0,002; 100 μ M: 30% p = 0,004) (siehe Abbildung 5A). Zellen behandelt mit 40 μ M 6-OHDA zeigten eine durchschnittliche Reduktion der Viabilität auf 52% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Zeitkinetik erfolgte mit 40 μ M 6-OHDA für 2 Std., 4 Std., 6 Std. und 24 Std. (n=4) (siehe Abbildung 5B). Lediglich nach 24 Stunden Inkubation mit 6-OHDA reduzierte sich die Viabilität primärer kortikaler Neurone signifikant auf 50% (p = 0,029). Zu früheren Zeitpunkten konnte durch Inkubation mit 40 μ M 6-OHDA keine signifikante Reduktion der Viabilität erzielt werden.

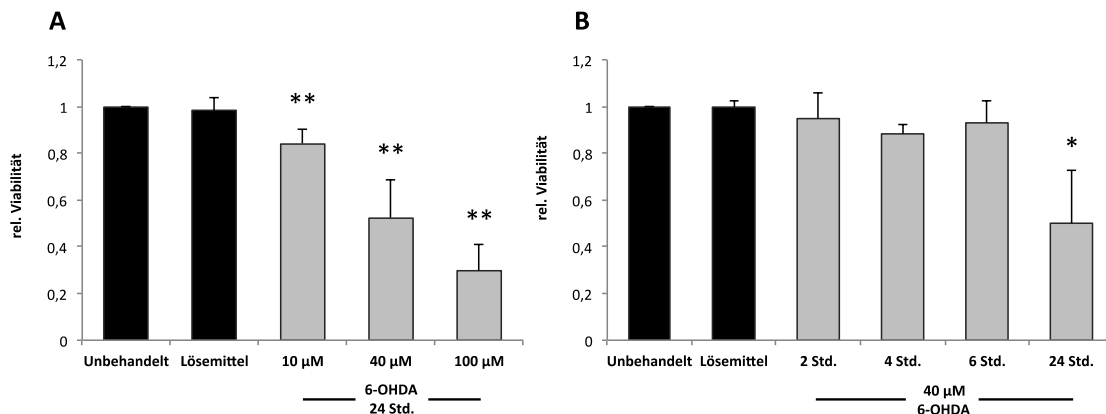


Abbildung 5: Einfluss von 6-OHDA auf die neuronale Zellviabilität.

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten. (* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001)

A Zellviabilität primärer kortikaler Neurone nach Inkubation mit 10 μ M, 40 μ M und 100 μ M 6-OHDA für 24 Stunden bei 37°C (n=6). Signifikante Reduktion der Zellviabilität nach Inkubation mit 10 μ M: 84% (p = 0,004); 40 μ M: 52% (p = 0,002); 100 μ M: 30% (p = 0,004). **B** Zellviabilität nach Behandlung mit 40 μ M 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Stunden (n=4). Signifikante Reduktion der Viabilität nach Inkubation für 24 Std.: 50% (p = 0,029).

Eine signifikante Reduktion der Zellzahl nach Inkubation primärer kortikaler Neurone mit 40 μ M 6-OHDA für 24 Stunden konnte in einem zweiten Verfahren reproduziert werden. In der Doppelfärbung zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion der Zellzahl auf 57% ($p = 0,003$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 6).

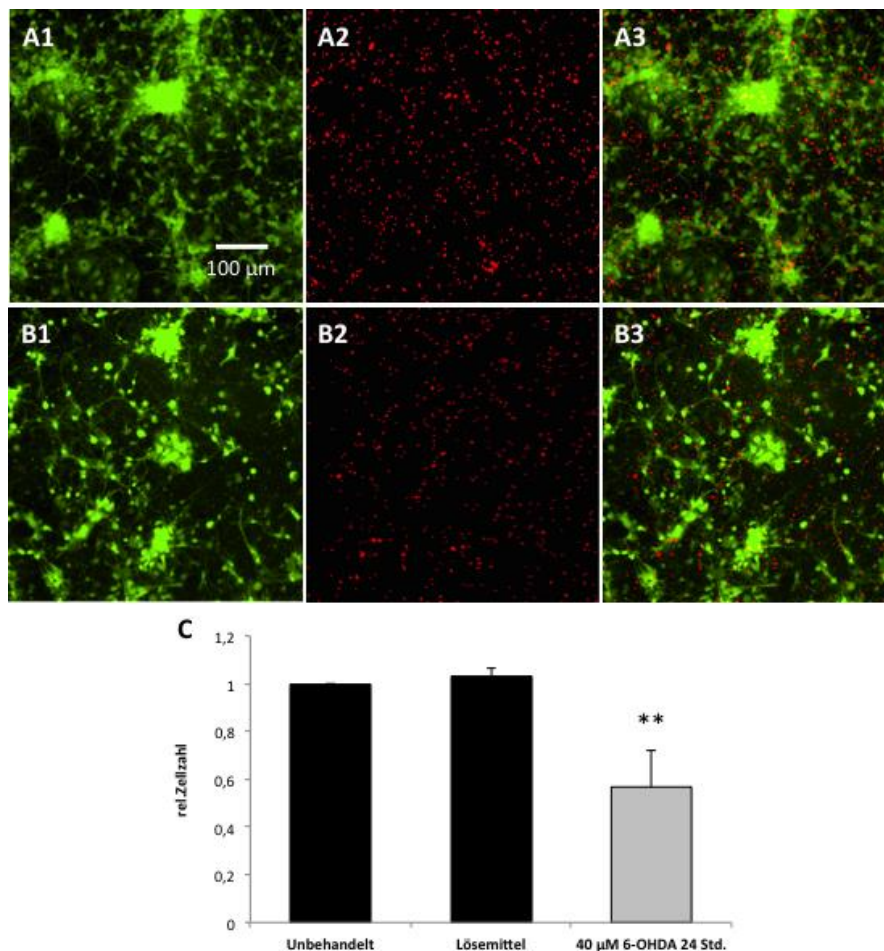


Abbildung 6: Einfluss von 6-OHDA auf die neuronale Zellvitalität.

Die Zellvitalität wurde mittels Doppelfärbung bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

A, B Exemplarische Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop. **A** unbehandelte kortikale Neurone, **B** kortikale Neurone nach Inkubation mit 40 μ M 6-OHDA für 24 Stunden bei 37°C, **1** vitale Zellen, **2** avitale Zellen, **3** kombinierte Darstellung.

C Graphische Darstellung der Zellzahl primärer kortikaler Neurone nach Inkubation mit 40 μ M 6-OHDA für 24 Stunden. Durchschnittliche Reduktion der Zellzahl nach Inkubation mit 6-OHDA auf 57% im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($p = 0,003$).

6.1.2 Proteinexpression

Primäre kortikale Neurone wurden für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit 40 μ M 6-OHDA inkubiert. Der zuvor ermittelte Schädigungszeitpunkt wurde um frühere Zeitpunkte ergänzt, um ebenfalls frühe UPR-Regulationsmechanismen zu erfassen. Diese sind häufig bereits innerhalb weniger Stunden aktiv (Fonseca et al., 2013) (siehe 3.4). Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Bestimmt wurde die Proteinexpression von ATF6, GRP78, CHOP und Caspase 3.

ATF6 besitzt eine geschnittene und eine ungeschnittene Form. Die Proteinexpression beider Formen wurde bestimmt (n=3). Für die ungeschnittene Form konnte eine signifikante Reduktion der Proteinexpression nach 24 Stunden auf eine nicht mehr nachweisbare relative Konzentration von 0% ($p = 0,009$) nachgewiesen werden. Zu früheren Zeitpunkten zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Proteinexpression, diese erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (2 Std.: 71%, $p = 0,2$; 4 Std.: 55%, $p = 0,2$; 6 Std.: 61%, $p = 0,1$). Für die geschnittene Form von ATF6 konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderungen der Proteinexpression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7A, B).

Nach Inkubation neuronaler Zellen mit 6-OHDA konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Proteinexpression von GRP78 induziert werden (n=3) (siehe Abbildung 7C, D).

Ebenso konnte durch die Behandlung mit 6-OHDA keine signifikante Änderung der Proteinexpression von CHOP erzielt werden (n=4). Ein optischer Anstieg der Bandenstärke nach 2 Stunden auf 129% ($p = 0,2$) sowie eine Reduktion der Bandenstärke nach 24 Stunden Inkubationszeit auf 44% ($p = 0,1$) blieben nach Auswertung der densitometrischen Ergebnisse ohne Erreichen des Signifikanzniveaus (siehe Abbildung 7E, F).

Bestimmt wurden die ungeschnittene und die geschnittene Form von Caspase 3 (n=4). Eine signifikante Änderung der Proteinexpression der ungeschnittenen Form durch die Inkubation mit 6 OHDA konnte nicht nachgewiesen werden. In unbehandelten Zellen ließ sich die geschnittene Form von Caspase 3 nicht nachweisen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit, sowie in einem einzelnen Fall auch nach 6 Stunden, konnte die geschnittene Form durch 6-OHDA induziert werden, ebenso in der Positivkontrolle. Bei starker Streuung

der Einzelwerte blieben diese unterhalb des Signifikanzniveaus (6 Std.: 62%, $p = 0,7$; 24 Std.: 118%, $p = 0,1$). Auch bei fehlender Signifikanz ist in diesem Fall aufgrund der Eindeutigkeit der optischen Ergebnisse von einer Aktivierung von Caspase 3 auszugehen (siehe Abbildung 7G, H).

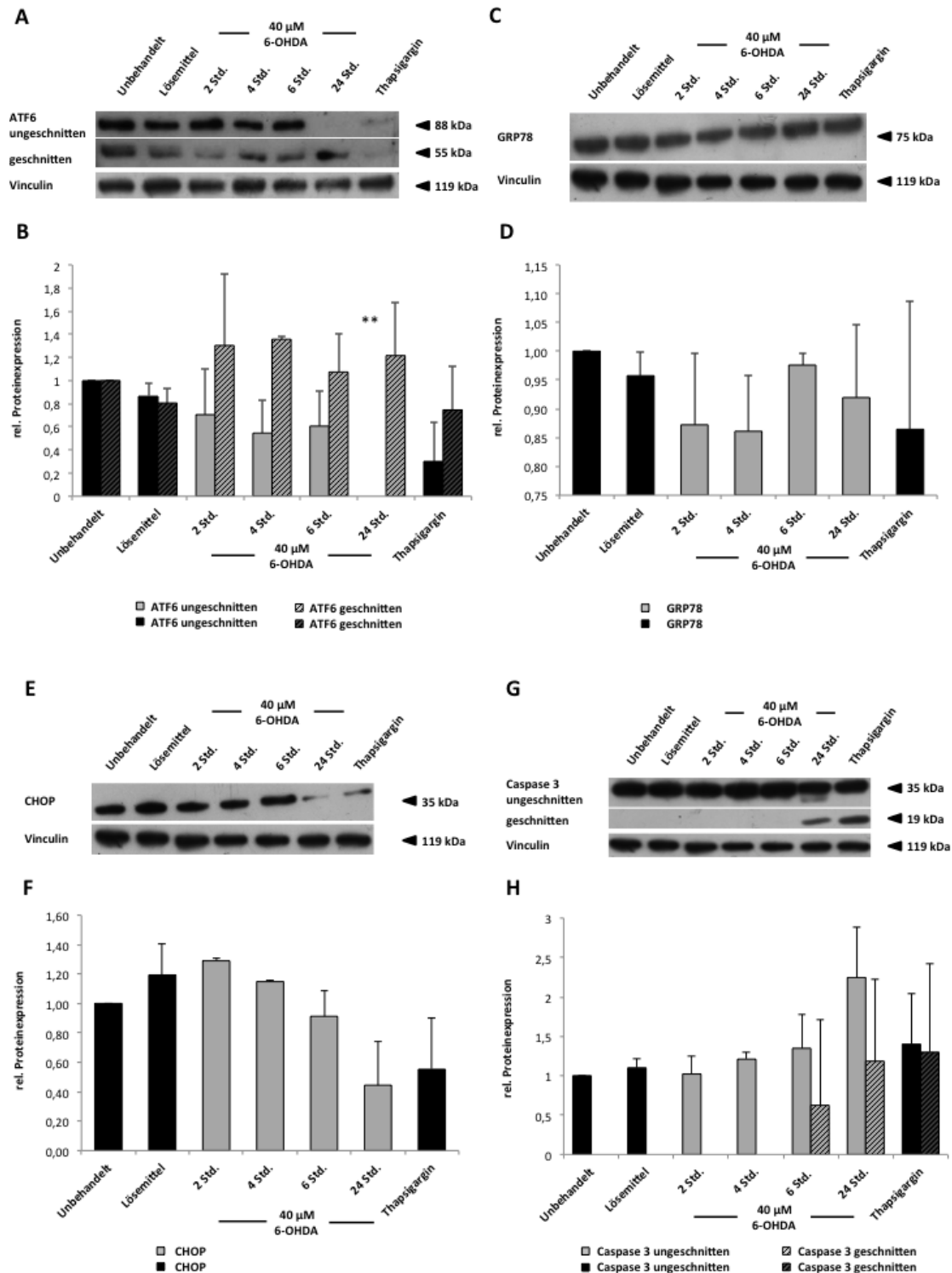


Abbildung 7: Neuronale ER-Stress Marker nach Inkubation mit 6-OHDA.

Western Blots aus Lysaten primärer kortikaler Neurone nach Inkubation mit 40 μM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Std.. Sofern nicht anders angegeben, wurden als Positivkontrolle Lysate aus Thapsigargin (2 μM für 24 Std.) behandelte Zellen verwendet. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

A, B Nachweis von ATF6 ($n=3$). **A** Western Blot. Dargestellt sind die geschnittene und die ungeschnittene Form von ATF6 sowie die Ladekontrolle Vinculin. **B** graphische Darstellung der Densitometrie. Geschnittene und ungeschnittene Form sind als gepaarte Balken dargestellt. (ungeschnitten: unschraffiert, geschnitten: schraffiert). Signifikante Reduktion der ungeschnittenen Form nach 24 Std.: 0% ($p = 0,009$).

C, D Nachweis von GRP78 ($n=3$). **C** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. **D** graphische Darstellung der Densitometrie.

E, F Nachweis von CHOP ($n=4$). **E** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. **F** graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung. Nicht signifikante Induktion von CHOP nach 2 Std. auf 129% ($p = 0,2$) sowie Reduktion der Proteinexpression nach 24 Std. auf 44% ($p = 0,1$).

G, H Nachweis von Caspase 3 ($n=4$). **G** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. Dargestellt sind ungeschnittene und geschnittene Form des Proteins. **H** graphische Darstellung der Densitometrie. Geschnittene und ungeschnittene Form sind als gepaarte Balken dargestellt. (ungeschnitten: unschraffiert, geschnitten: schraffiert). Induktion der geschnittenen Form nach 6 Std.: 62% ($p = 0,7$), 24 Std.: 118% ($p = 0,1$).

6.2 Das mikrogliale 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell

6.2.1 Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung

Primäre murine mesenzephalische Mikroglia wurden für 24 Stunden mit 100 μM , 200 μM und 400 μM 6-OHDA inkubiert ($n=3$). Zellen behandelt mit 100 μM 6-OHDA zeigten eine durchschnittliche Reduktion der Viabilität auf 70% ($p = 0,159$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Für die Inkubation mit 200 μM zeigte sich eine Reduktion auf 59% ($p = 0,148$) und bei 400 μM auf 19% ($p = 0,039$). Bei initial starker Streuung der Werte konnte nach Inkubation mit 200 μM keine signifikante Viabilitätseinschränkung induziert werden (siehe Abbildung 8A).

In der weiterführenden Zeitkinetik zeigte sich auch bei 200 μM eine deutlich signifikante Einschränkung der Viabilität. In der Zeitkinetik wurden die Zellen mit 200 μM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Stunden inkubiert ($n=3$). Nach 24 Stunden reduzierte sich die Zellviabilität signifikant auf durchschnittlich 46% ($p = 0,001$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Für die anderen Zeitpunkte konnte keine signifikante Viabilitätseinschränkung verzeichnet werden (siehe Abbildung 8B).

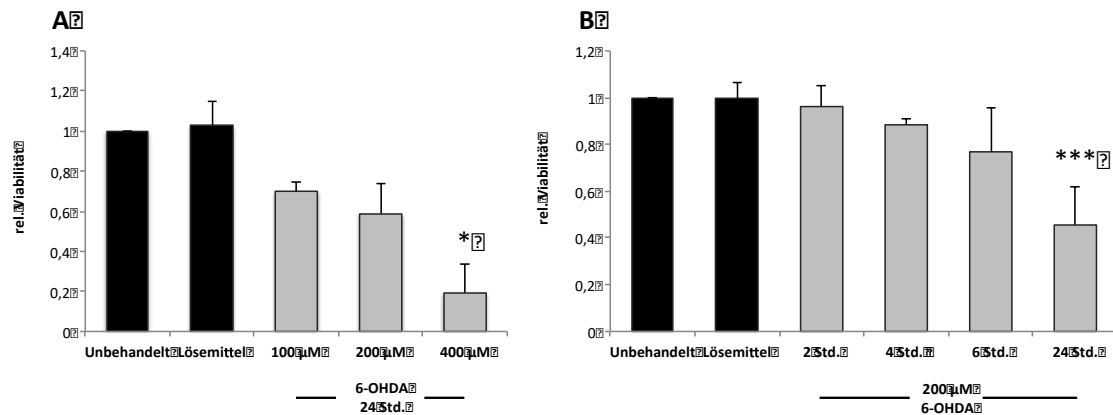


Abbildung 8: Einfluss von 6-OHDA auf die mikrogliale Zellviabilität.

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A Zellviabilität primärer mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 100 µM, 200 µM und 400 µM 6-OHDA für 24 Std. bei 37°C, 200 µM: 59%, $p = 0,148$; 400 µM: 19%, $p = 0,039$.

B Zellviabilität nach Inkubation mit 200 µM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Std. (24 Std.: 46%, $p = 0,001$).

Der schädigende Effekt von 6-OHDA auf primäre mesenzephaler Mikroglia konnte in einem zweiten Verfahren nicht verifiziert werden. In der Doppelfärbung konnte nach Inkubation mit 200 µM 6-OHDA für 24 Stunden eine durchschnittliche Reduktion der Zellzahl auf 59% ($p = 0,1$) der Ausgangszellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen gezeigt werden. Die Reduktion der Zellzahl blieb jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (siehe Abbildung 9).

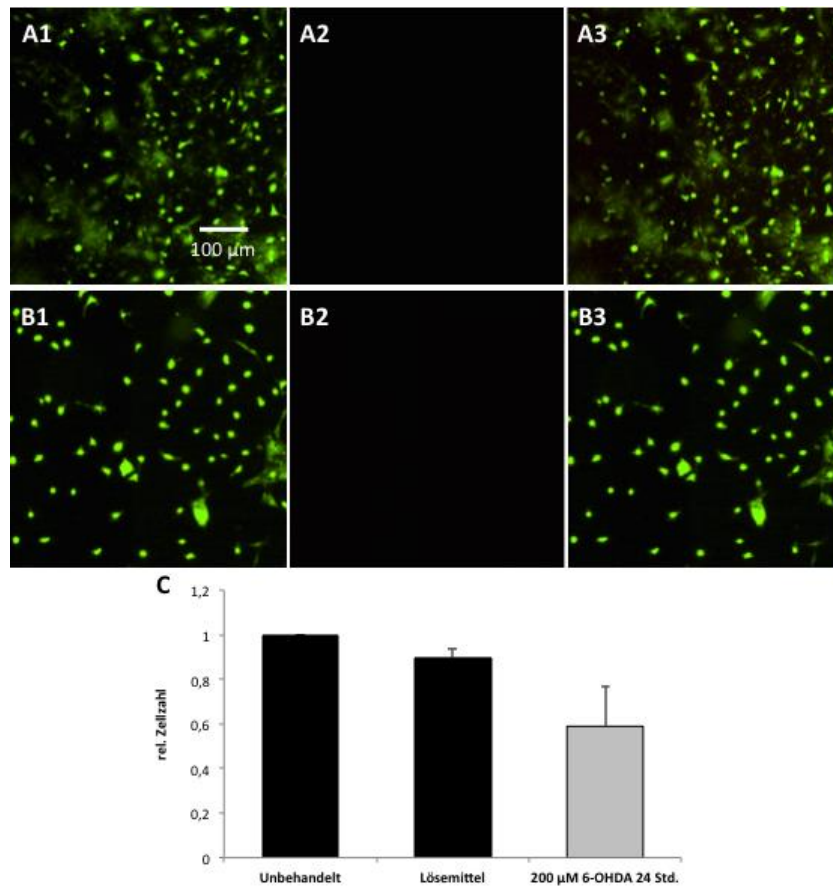


Abbildung 9: Einfluss von 6-OHDA auf die mikrogliale Zellvitalität.

Die Zellvitalität wurde mittels Doppelfärbung bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A, B Exemplarische Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop, **A** unbehandelte mesenzepale Mikroglia, **B** mesenzepale Mikroglia nach Inkubation mit 200 μ M 6-OHDA für 24 Stunden bei 37°C. **1** vitale Zellen, **2** avitale Zellen, **3** kombinierte Darstellung

C Graphische Darstellung der Zellzahl primärer mesenzepaler Mikroglia nach Inkubation mit 200 μ M 6-OHDA für 24 Std.: 95%, $p = 0,1$.

6.2.2 Inflammatorische Aktivität

Die Bestimmung der Zytokine aus dem Nährmedium der Mikroglia erfolgte nach Inkubation für 2, 4, 6, und 24 Stunden mit 200 μ M 6-OHDA ($n=3$) entsprechend den Behandlungszeitpunkten der Zeitkinetik. Ein signifikanter Anstieg der Zytokine IL-6 und TNF- α im Nährmedium konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10A, B). Die Potenz der Zellen zur Aktivierung und Ausschüttung von Zytokinen konnte in der Positivkontrolle durch Inkubation mit

LPS gezeigt werden. Hier ist ein deutlicher Anstieg für beide Zytokine zu verzeichnen.

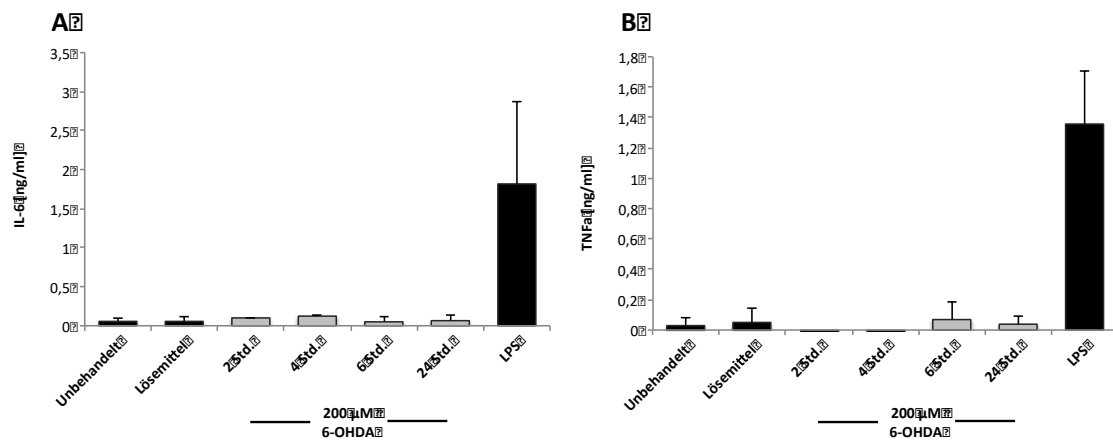


Abbildung 10: Einfluss von 6-OHDA auf die Zytokinausschüttung.

Zytokin-ELISA. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A IL-6 Konzentration [ng/ml] **B** TNF-α [ng/ml] im Nährmedium mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 200 μM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Std. Positivkontrolle LPS 1 μg/ml für 24 Std..

Die Bestimmung des Nitritgehalts aus dem Nährmedium der Mikroglia erfolgte ebenso nach Inkubation für 2, 4, 6, und 24 Stunden mit 200 μM 6-OHDA (n=2). Nach 24 Stunden Inkubationszeit war ein geringer Anstieg von Nitrit (NO) auf durchschnittlich 1,17 μM ($p = 0,133$) zu verzeichnen, blieb aber unterhalb des Signifikanzniveaus (siehe Abbildung 11).

Die Behandlung mit 6-OHDA führt demnach zwar zu einer Schädigung der Zellen, nicht aber zu deren Aktivierung im Sinne von einer Zytokin- oder Nitrit-ausschüttung.

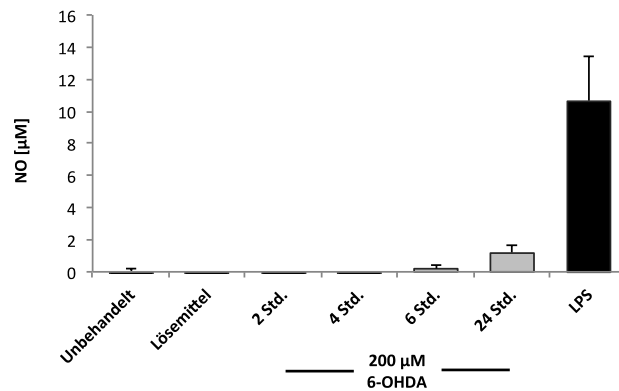


Abbildung 11: Einfluss von 6-OHDA auf die Nitritausschüttung.

Griess-Assay, Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

NO-Konzentration [µM] im Nährmedium mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 200 µM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Std. Positivkontrolle: LPS 1 µg/ml, 24 Std.: 1,17 µM, $p = 0,133$.

6.2.3 Proteinexpression

Primäre mesenzephalische Mikroglia wurden für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit 200 µM 6-OHDA inkubiert. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Bestimmt wurde die Proteinexpression von GRP78, ATF6, Caspase 3 und CHOP.

Die Bestimmung von GRP78 ($n=5$) konnte eine signifikante Reduktion der Proteinexpression nach 4 und 6 Stunden zeigen. Nach 4 Stunden sank die gemessene Proteinexpression auf durchschnittlich 90% ($p = 0,024$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen, nach 6 Stunden auf 75% ($p = 0,024$). Zu früheren und späteren Zeitpunkten blieb die Proteinexpression unverändert. Signifikante Änderungen der Positivkontrolle konnten ebenfalls nicht verzeichnet werden (siehe Abbildung 12A, B).

Bestimmt wurden die ungeschnittene und die geschnittene Form von Caspase 3 ($n=5$). Eine signifikante Änderung der Proteinexpression der ungeschnittenen Form konnte zu keinem Inkubationszeitpunkt induziert werden. Die Induktion der geschnittenen Form war durch 6-OHDA ebenfalls nicht möglich. Mithilfe einer Positivkontrolle konnte eine Fehlfunktion des verwendeten Antikörpers ausgeschlossen werden. Verwendet wurden primäre kortikale Neurone

nach Inkubation mit Thapsigargin, in welchen zuvor der Nachweis von geschnittener Caspase gelang (siehe Abbildung 12C, D).

Der Nachweis von ATF6 in mesenzephalen Mikroglia wurde mehrfach versucht (n=4). Die Ergebnisse zeigten sehr hohe interexperimentelle Schwankungen, sodass eine Reproduktion bestehender Ergebnisse nicht möglich war. Auf die Abbildung wurde an dieser Stelle verzichtet.

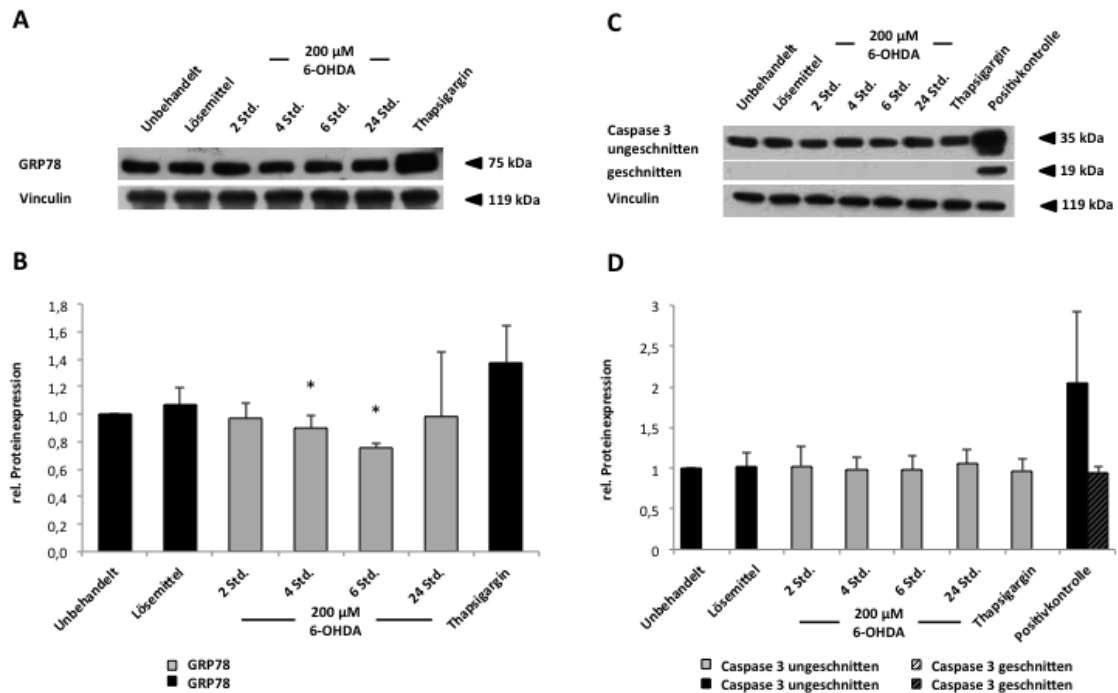


Abbildung 12: Mikrogliale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit 6-OHDA.

Western Blots aus Lysaten primärer mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 200 µM 6-OHDA für 2, 4, 6 und 24 Std. Sofern nicht anders angegeben wurden als Positivkontrolle Lysate aus Thapsigargin (2 µM für 24 Std.) behandelten Zellen verwendet (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

A, B Nachweis von GRP78 (n=5). **A** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. Proteinexpression von GRP78.

B graphische Darstellung der Densitometrie.

C, D Nachweis von Caspase 3 (n=5). **C** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. Dargestellt sind ungeschnittene und geschnittene Form des Proteins. **D** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung, geschnittene und ungeschnittene Form sind als gepaarte Balken dargestellt (ungeschnitten: ungeschrafft, geschnitten: schrafft), Positivkontrolle: primäre kortikale Neurone 24 Std. inkubiert mit Thapsigargin 2 µM.

6.2.4 CHOP in mesenzephalen Mikroglia

Mit Hilfe von Western-Blot Analysen war ein Nachweis von CHOP in mesenzephalen Mikroglia nicht möglich (n=3). Durch Inkubation mit der schädigenden Substanz 200 μ M 6-OHDA für 24 Stunden konnte CHOP ebenfalls nicht induziert werden. Zur Detektion geringster Proteinkonzentrationen wurden bis zu 60 μ g Gesamt-Protein aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte kortikale Neurone verwendet, in denen der Nachweis von CHOP zuvor bereits möglich war (siehe Abbildung 13).

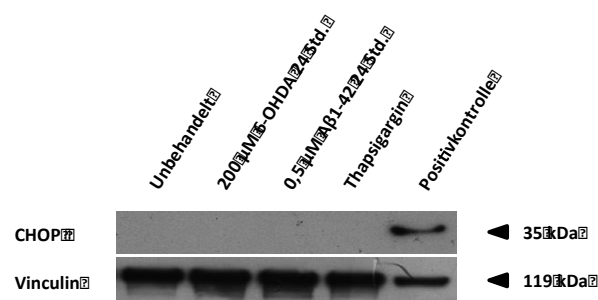


Abbildung 13: Expression von CHOP in mikroglialen Zellen.

Western Blots aus Lysaten primärer mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 200 μ M 6-OHDA für 24 Std. und 0,5 μ M A β 1-42 für 24 Std. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte kortikale Neurone verwendet; Ladekontrolle Vinculin, (n= 3). In mesenzephaler Mikroglia ist ein Nachweis von CHOP durch Western Blot-Analysen nicht möglich.

6.3 Das neuronale Amyloid-beta1-42 Schädigungsmodell

6.3.1 Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung

Primäre kortikale Neurone wurden 24 Stunden mit 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M A β 1-42 inkubiert (n=3). Für die Konzentrationen 1 μ M und 5 μ M zeigte sich eine durchschnittliche signifikante Reduktion der Viabilität auf 52% (p = 0,005) sowie auf 46% (p = 0,002) im Vergleich zur Viabilität unbehandelter Zellen. Nach Inkubation mit 0,5 μ M konnte im Durchschnitt eine Reduktion der Viabilität auf 67% ohne Signifikanz gezeigt werden (p = 0,086) (siehe Abbildung 14A). Aufgrund der initial großen Streuung der Messwerte ließ sich in der Konzentrationsreihe für 0,5 μ M A β 1-42 keine Signifikanz errechnen. In der anschließenden Zeitkinetik wurden die Zellen mit 0,5 μ M A β 1-42 für 2, 4, 6 und

24 Stunden inkubiert (n=4). Nach 24 Stunden Inkubationszeit reduzierte sich die Viabilität der Zellen signifikant auf durchschnittlich 66% im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($p = 0,006$). Zu früheren Zeitpunkten konnte keine signifikante Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14B).

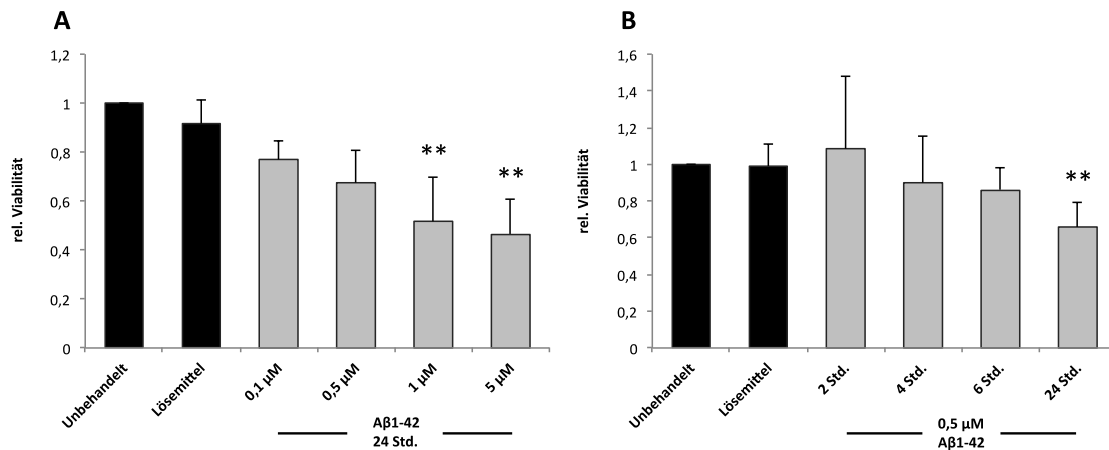


Abbildung 14: Einfluss von A β 1-42 auf die neuronale Zellviabilität.

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus wiederholten unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A (n=3), Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM A β 1-42 für 24 Stunden bei 37°C. Signifikante Reduktion der Viabilität nach Inkubation mit 1 μM : 52% ($p = 0,005$), 5 μM : 46% ($p = 0,002$) **B** (n=4) Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 0,5 μM A β 1-42 für 2, 4, 6 und 24 Std. bei 37°C. Signifikante Reduktion nach 24 Std. auf 66% ($p = 0,006$).

Primäre kortikale Neurone wurden 24 Stunden mit 0,5 μM A β 1-42 inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl in der Doppelfärbung bestimmt (n=3). Durch die Inkubation mit A β 1-42 konnte keine Reduktion der Zellzahl induziert werden. Die relative Zellzahl lag nach 24 Stunden Inkubation bei 104% ($p = 0,947$) (siehe Abbildung 15). Damit konnte der toxische Effekt von A β 1-42 aus den vorangegangenen Versuchen in der Doppelfärbung nicht reproduziert werden. Es wurden mehrere Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe mit steigenden Konzentrationen A β 1-42 bis einschließlich 10 μM durchgeführt. Eine Reduktion der Zellzahl konnte in keinem Versuch erreicht werden.

Für folgende Versuche zum Nachweis von ER-Stress-Proteinen wurde auf die Ergebnisse der MTT-Testung zurückgegriffen.

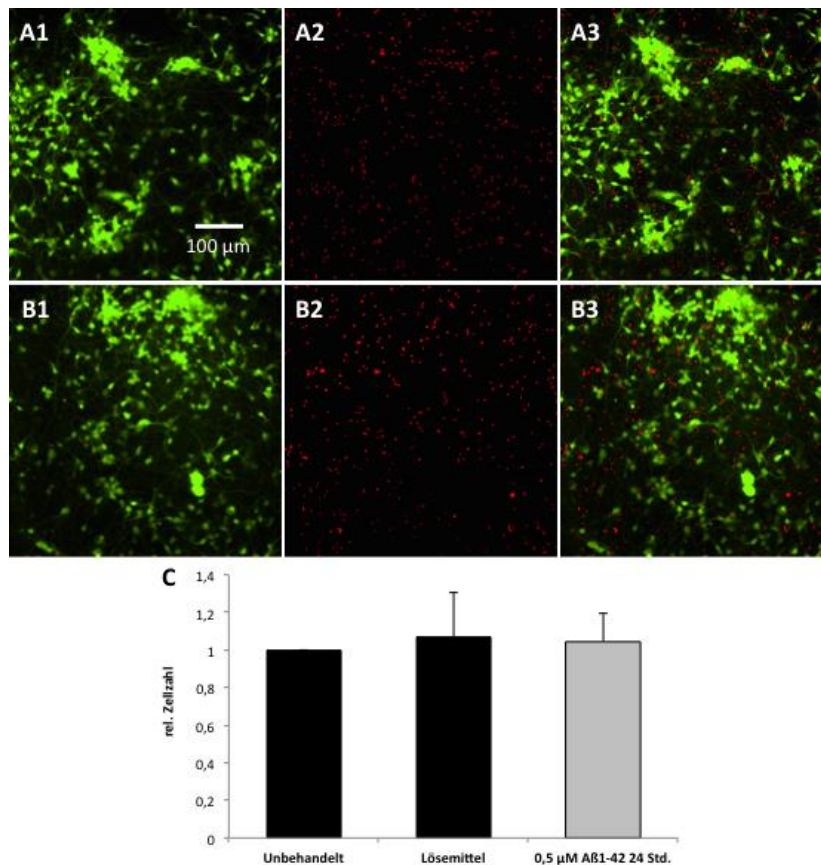


Abbildung 15: Einfluss von Aβ1-42 auf die neuronale Zellvitalität.

Die Zellvitalität wurde mittels Doppelfärbung bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A, B Exemplarische Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop. **A** unbehandelte Neurone, **B** primäre kortikale Neurone nach Inkubation mit 0,5 μM Aβ1-42 für 24 Stunden bei 37°C, **1** vitale Zellen, **2** avitale Zellen, **3** kombinierte Darstellung.

C Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl primärer kortikaler Neurone nach Inkubation mit 0,5 μM Aβ1-42 für 24 Stunden: 104% ($p = 0,947$).

6.3.2 Proteinexpression

Primäre kortikale Neurone wurden für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit 0,5 μM Aβ1-42 inkubiert. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Bestimmt wurde die Proteinexpression von ATF6, GRP78, CHOP und Caspase 3.

Für die geschnittene ebenso wie die ungeschnittene Form von ATF6 konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Proteinexpression nachgewiesen werden ($n=4$). Optisch zeigte sich im Western Blot nach 24 Stunden Inkubationszeit eine deutliche Zunahme der Proteinexpression der ungeschnit-

tenen Form. In der Positivkontrolle wurde eine deutliche Reduktion induziert. Die geschnittene Form zeigte im Western Blot keine deutlichen Änderungen der Proteinexpression (siehe Abbildung 16A). Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden ergab eine Zunahme der geschnittenen Form zu jedem getesteten Zeitpunkt sowie einen Peak nach 4 Stunden Inkubationsdauer mit einer relativen Proteinexpression von 216% ohne Signifikanz ($p = 0,065$). Die Positivkontrolle zeigt eine nicht signifikante Reduktion der ungeschnittenen Form nach Behandlung mit Thapsigargin auf 67% ($p = 1,0$). Für die geschnittene Form ließen sich densitometrisch zu keinem Inkubationszeitpunkt Änderungen der Proteinexpression nachweisen (siehe Abbildung 16B).

Die Bestimmung der Proteinexpression von GRP78 erfolgte fünfmal ($n=5$). Zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten ließen sich keine Veränderungen der Proteinexpression nachweisen (siehe Abbildung 16C, D).

Nach 24 Stunden Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ A β 1-42 nahm die Proteinexpression von CHOP in kortikalen Neuronen zu ($n=3$). In der Positivkontrolle zeigte sich optisch eine deutliche Reduktion der CHOP-Expression (siehe Abbildung 16E). In der densitometrischen Auswertung konnte die Zunahme der Expression auf eine relative Zahl von 149% ($p = 1,0$) nach 24 Stunden Inkubation reproduziert werden, erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau, die Positivkontrolle zeigte eine Reduktion auf 92% ($p = 1,0$) (siehe Abbildung 16F).

Durch die Inkubation mit A β 1-42 oder Thapsigargin ließen sich keine Änderungen in der Proteinexpression der ungeschnittenen oder der geschnittenen Form von Caspase 3 induzieren. In der Positivkontrolle war die Induktion der geschnittenen Form von Caspase 3 durch Thapsigargin jedoch möglich ($n=4$) (siehe Abbildung 16G, H).

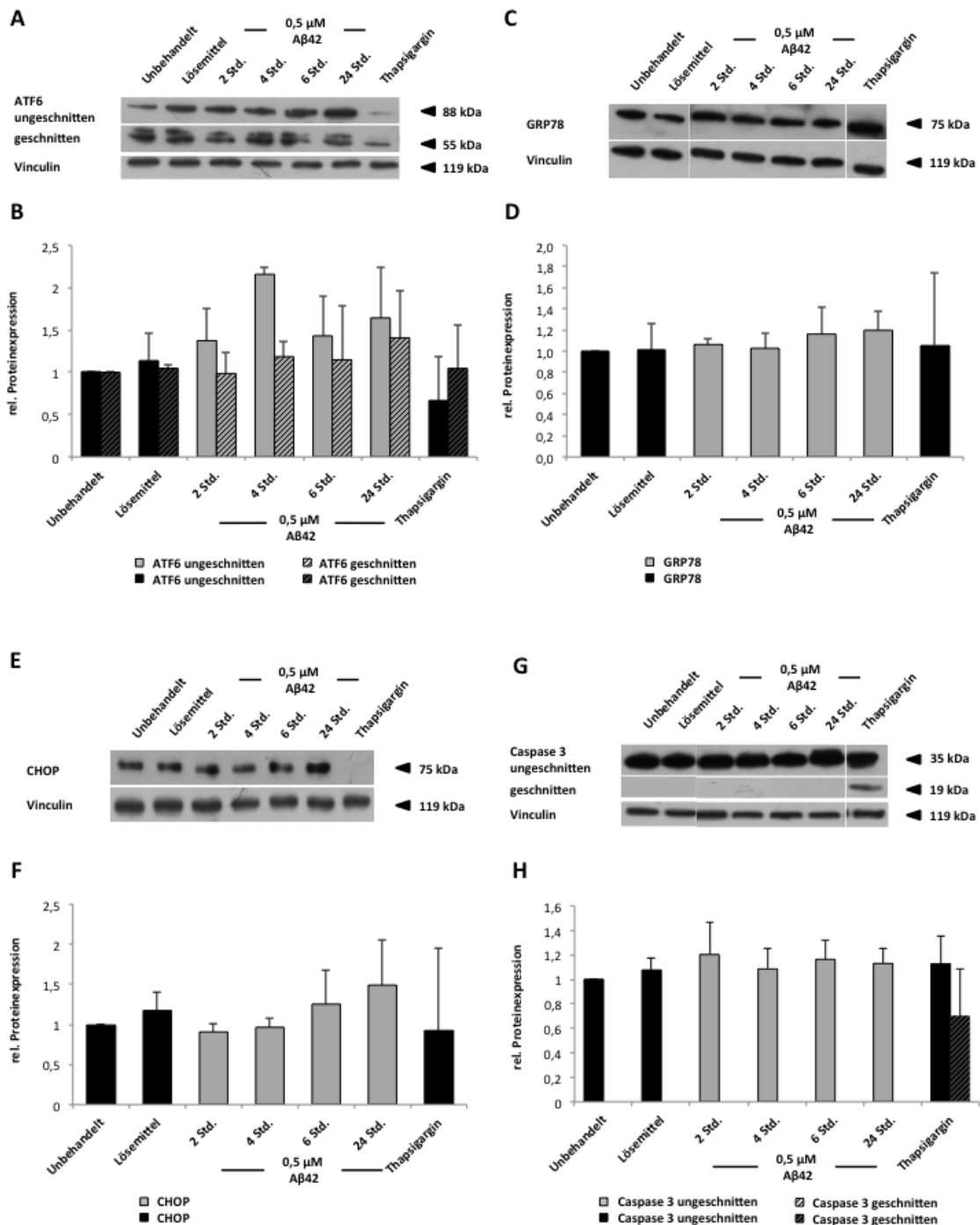


Abbildung 16: Neuronale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit A β 1-42.

Western Blots aus Lysaten primärer kortikaler Neurone nach Inkubation mit 0,5 μ M A β 1-42 für 2, 4, 6 und 24 Stunden (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A, B Nachweis von ATF6 (n=4). **A** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin, dargestellt sind die ungeschnittene und die geschnittene Form von ATF6. **B** graphische Darstellung der Densitometrie. Geschnittene und ungeschnittene Form sind als gepaarte Balken dargestellt. (ungeschnitten: unschraffiert, geschnitten: schraffiert).

C, D Nachweis von GRP78 (n=5). **C** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. **D** graphische Darstellung der Densitometrie.

E, F Nachweis von CHOP (n=3). **E** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. **F** graphische Darstellung der densitometrischen Messung.

G, H Nachweis von Caspase 3 (n=4). **G** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin, dargestellt sind die ungeschnittene sowie die geschnittene Form des Proteins. **H** graphische Darstellung der Densitometrie. Ungeschnittene und geschnittene Form sind als gepaarte Balken dargestellt (ungeschnitten: unschraffiert, geschnitten: schraffiert).

6.4 Das mikrogliale Amyloid-beta1-42 Schädigungsmodell

6.4.1 Konzentrations- und zeitabhängige Schädigung

Primäre mesenzephalale Mikroglia wurden für 24 Stunden mit 0,1 μM , 1 μM und 10 μM A β 1-42 inkubiert (n=3). Aufgrund eines toxischen Effekts des Lösemittels auf die untersuchten Mikroglia erfolgte die statistische Auswertung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Für jede Konzentration konnte eine signifikante Reduktion der Viabilität nachgewiesen. Nach Inkubation mit 0,1 μM A β 1-42 sank die Zellviabilität im Durchschnitt auf 56% im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($p = 0,013$). Nach Inkubation mit 1 μM und 10 μM A β 1-42 kam es zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität auf durchschnittlich 48% ($p = 0,003$) bzw. 40% ($p = 0,001$) (siehe Abbildung 17A).

Die Zeitkinetiken erfolgten aufgrund der Schädigung im gesuchten Zielbereich von 50-70% mit 0,1 μM A β 1-42 für 2, 4, 6 und 24 Stunden (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte erneut im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Nach 4 Stunden zeigte sich bereits eine signifikante Reduktion der Viabilität auf 49% ($p = 0,033$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach 6 Stunden ($p = 0,014$) und nach 24 Stunden Inkubation betrug die Viabilität noch 39% ($p = 0,001$) (siehe Abbildung 17B).

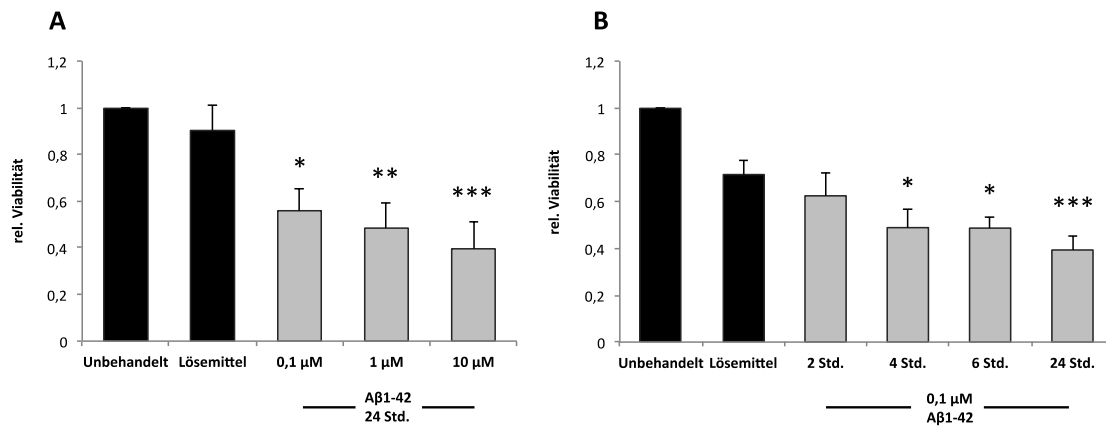


Abbildung 17: Einfluss von Aβ1-42 auf die mikrogliale Zellviabilität.

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Triplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A Zellviabilität primärer mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 0,1 μM, 1 μM, 10 μM Aβ1-42 für 24 Stunden bei 37°C. Signifikante Reduktion der Viabilität nach Inkubation mit 0,1 μM auf 56% ($p = 0,013$), 1 μM: 48% ($p = 0,003$), 10 μM: 40% ($p = 0,001$). **B** Zellviabilität nach Behandlung mit 0,1 μM Aβ1-42 für 2, 4, 6 und 24 Stunden. Signifikante Reduktion der Viabilität nach 4 Stunden Inkubationszeit auf 49% ($p = 0,033$), 6 Stunden: 39% ($p = 0,014$), 24 Stunden: 39% ($p = 0,001$).

Auch für das Aβ1-42-Schädigungsmodell wurde die Doppelfärbung als zweite Methode zur Feststellung der Zellschädigung durchgeführt. Primäre mesenzephalere Mikroglia wurden für 24 Stunden mit 0,1 μM Aβ1-42 inkubiert ($n=3$). Aufgrund der Lösemitteltoxizität erfolgte die statistische Berechnung im Verhältnis zur Lösemittelkontrolle.

Nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 μM Aβ1-42 konnte keine signifikante Reduktion der Zellzahl erzielt werden. Die relative Zellzahl nach Aβ-Inkubation betrug 81% ($p = 0,31$), nach Lösemittel-Inkubation 83% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 18).

Analog zur Doppelfärbung in Aβ-behandelten Neuronen wurde der Versuch mehrfach mit steigenden Konzentrationen wiederholt, ohne eine Reduktion der Zellzahl erzielen zu können (siehe 6.3.1)

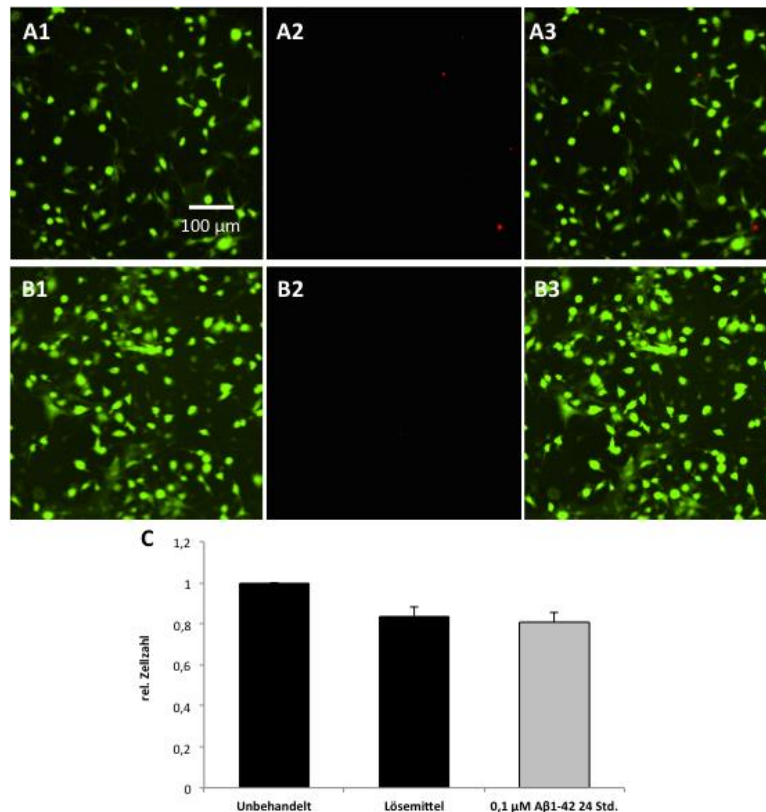


Abbildung 18: Einfluss von Aβ1-42 auf die mikrogliale Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde mittels Doppelfärbung bestimmt. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A, B Exemplarische Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop. **A** unbehandelte mesenzepmale Mikroglia, **B** mesenzepmale Mikroglia nach Behandlung mit 0,1 µM Aβ1-42 für 24 Stunden bei 37°C, **1** vitale Zellen, **2** avitale Zellen, **3** kombinierte Darstellung.

C Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl primärer mesenzepmaler Mikroglia nach Inkubation mit 0,1 µM Aβ1-42 für 24 Stunden. Nicht signifikante Reduktion der Zellzahl auf 81% ($p = 0,31$) nach Inkubation mit 0,1 µM Aβ1-42.

6.4.2 Inflammatorische Aktivität

Die Bestimmung der Zytokine aus dem Nährmedium der Mikroglia erfolgte nach Inkubation für 2, 4, 6, und 24 Stunden mit 0,1 µM Aβ1-42 ($n=3$) entsprechend den Behandlungszeitpunkten der Zeitkinetik. Ein signifikanter Anstieg der Zytokine IL-6 und TNF-α im Nährmedium konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit LPS wurde ein deutlicher Anstieg für beide Zytokine verzeichnet (siehe Abbildung 19A, B).

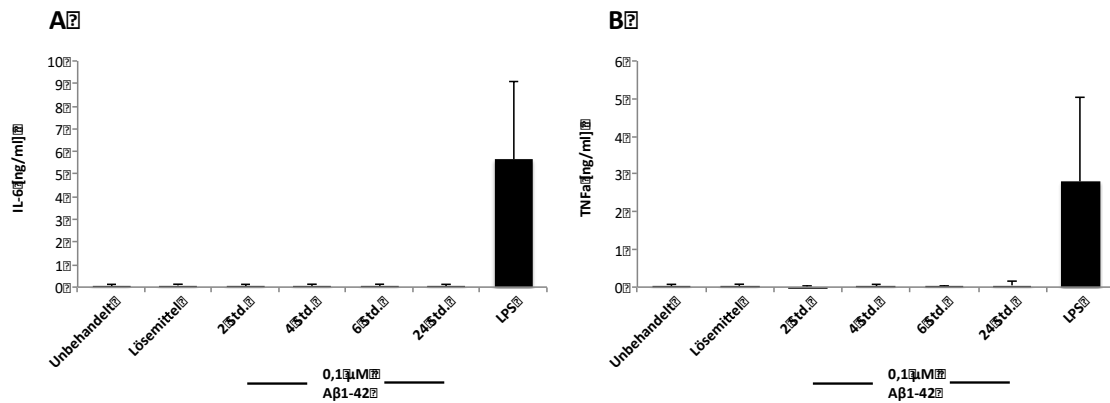


Abbildung 19: Einfluss von Aβ1-42 auf die Zytokinausschüttung.

Zytokin-ELISA. Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A IL-6 Konzentration [ng/ml] **B** TNF-α [ng/ml] im Nährmedium mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 0,1 μM Aβ1-42 für 2, 4, 6 und 24 Std. Positivkontrolle LPS 1 μg/ml.

Die Bestimmung des Nitritgehalts aus dem Nährmedium der Mikroglia erfolgte nach Inkubation für 2, 4, 6, und 24 Stunden mit 0,1 μM Aβ1-42 (n=3). Ein Anstieg der Nitritkonzentration im Nährmedium konnte nicht induziert werden. In der Positivkontrolle wurde ein deutlicher Anstieg von Nitrit verzeichnet (siehe Abbildung 20).

Eine Aktivierung der mikroglialen Zellen konnte durch die Behandlung mit 0,1 μM Aβ1-42 nicht induziert werden. Die Auswahl von Schädigungszeitpunkt und -konzentration stützt sich auf die Ergebnisse der MTT-Testung.

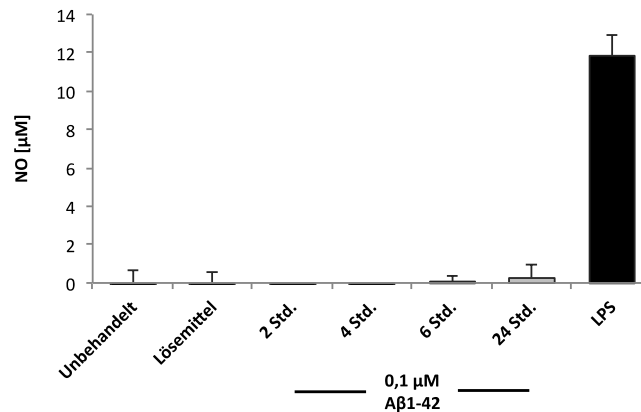


Abbildung 20: Einfluss von A β 1-42 auf die Nitritausschüttung.

Griess-Assay, Die Auswertungen zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

NO-Konzentration [µM] im Nährmedium mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 0,1 µM A β 1-42 für 2, 4, 6 und 24 Std. Positivkontrolle: LPS 1 µg/ml.

6.4.3 Proteinexpression

Primäre mesenzephalale Mikroglia wurden für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit 0,1 µM A β 1-42 inkubiert. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Bestimmt wurde die Proteinexpression von GRP78 und Caspase 3. Die Expression von CHOP in murinen mesenzephalen Mikroglia ließ sich nicht nachweisen, wie bereits im Schädigungsmodell mit 6-OHDA erläutert (Siehe hierzu 6.2.4.).

Nach je 4, 6, und 24 Stunden Inkubation mit A β 1-42 kam es zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression von GRP78. So sank die relative Proteinexpression nach 4 Stunden auf 94% ($p = 0,016$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen, nach 6 Stunden auf 86% ($p = 0,016$) und nach 24 Stunden auf 93% ($p = 0,008$). In den Thapsigargin-behandelten Zellen der Positivkontrolle kam es zu einem Anstieg der Proteinexpression auf durchschnittlich 154% ($p = 0,008$) ($n=4$) (siehe Abbildung 21A, B).

Die Bestimmung von Caspase 3 erfolgte für die geschnittene und die ungeschnittene Form ($n=4$). Es konnte keine Änderung der Proteinexpression der ungeschnittenen Form durch Inkubation mit 0,1 µM A β 1-42 oder Thapsigargin nachgewiesen werden. Eine Induktion der geschnittenen Form konnte ebenfalls nicht erzielt werden. Als Positivkontrolle wurden Thapsigargin-behandelte

Neurone verwendet, in denen sich die geschnittene Form zuvor induzieren ließ (siehe Abbildung 21C, D).

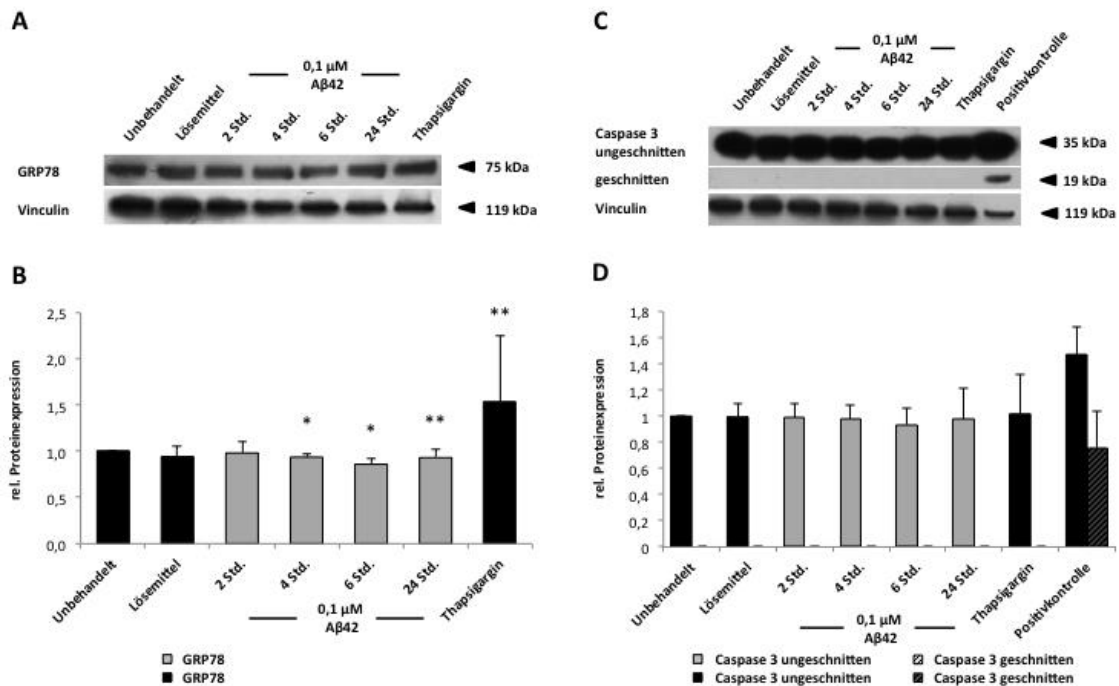


Abbildung 21: Mikrogliale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit Aβ1-42.

Western Blots aus Lysaten mesenzephaler Mikroglia nach Inkubation mit 0,1 µM Aβ1-42 für 2, 4, 6 und 24 Stunden (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A, B Nachweis von GRP78 (n=4). **A** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin. **B** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung. Signifikante Reduktion der Proteinexpression nach 4 Std. auf 94% ($p = 0,016$), nach 6 Std. auf 86% ($p = 0,016$), nach 24 Std. auf 93% ($p = 0,008$). Anstieg der Proteinexpression in der Positivkontrolle auf 154% ($p = 0,008$).

C, D Nachweis von Caspase 3 (n=4). **C** Western Blot, Ladekontrolle Vinculin **D** graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung. Dargestellt sind die ungeschnittene sowie die geschnittene Form als gepaarte Balken (ungeschnitten: unschraffiert, geschnitten: schraffiert). Kein Nachweis einer geänderten Proteinexpression der ungeschnittenen Form, kein Nachweis einer Induktion der geschnittenen Form. Als Positivkontrolle wurden primäre kortikale Neurone verwendet, welche 24 Stunden mit Thapsigargin 2 µM behandelt wurden.

7 Diskussion

7.1 Das 6-Hydroxydopamin-Schädigungsmodell

Ziel dieser Arbeit war es, in bereits etablierten AD- und PD-Schädigungsmodellen ER-Stress zu untersuchen. Die Versuche mit 6-OHDA konnten dazu folgende Erkenntnisse liefern: Durch 6-Hydroxydopamin lässt sich sowohl in Neuronen als auch in Mikroglia eine potente Schädigung induzieren, welche konsekutiv eine geänderte Expression verschiedener UPR-Proteine nach sich zieht. Eine Schädigung, welche sich stärker in der Einschränkung der Viabilität als in der Reduktion der Zellzahl widerspiegelt, ist hierbei stärker zu gewichten, da die Mechanismen des ER-Stress aktiv sind, bevor es zur Apoptose kommt. Eine gleichzeitige Aktivierung der Mikrogliazellen durch das schädigende Agens konnte nicht erzielt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 6-OHDA in neuronalen Zellen die Induktion von ATF6 bewirkt, ebenso wie von Caspase 3. Auf die Expression aller anderen getesteten Proteine hatte 6-OHDA keinen Einfluss. In den Versuchen mit mikroglialen Zellen konnte gezeigt werden, dass 6-OHDA zu einer Reduktion der Proteinexpression von GRP78 führt. Die Expression von CHOP in Mikrogliazellen war nicht nachweisbar (siehe Abbildung 22).

Die zuvor zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen, dass die neuronalen und mikroglialen Schädigungsmodelle mit 6-OHDA funktional sind und zu einer Aktivierung oder Beeinflussung von ER-Stress-Signalketten führen. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse wird jedoch klar, dass zwischen neuronalen und mikroglialen Zellen einige Unterschiede bestehen.

1. Zunächst fällt auf, dass es in beiden Zelltypen zu einer veränderten Expression von nur einigen der untersuchten Proteine kommt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression mancher Proteine unbeeinflusst bleibt.
2. Interessanterweise sind es in neuronalen und mikroglialen Zellen nicht die gleichen Proteine, welche durch 6-OHDA induziert werden. In neuronalen Zellen sind ATF6 und Caspase 3 beeinflusst, in Mikroglia GRP78.
3. Eine Zu- oder Abnahme der Proteinexpression geschieht zu sehr verschiedenen Zeitpunkten.
4. Die geänderte Expression von ER-Stress-Proteinen in Mikroglia ist nicht an deren Aktivierung gekoppelt.

5. Einzelne Proteine der UPR sind nicht nachweisbar. Es gelang nicht, CHOP in mikroglialen Zellen nachzuweisen.

7.1.1 Zelltypabhängige ER-Stress-Aktivierung

Wie zuvor zusammengefasst, konnte in Neuronen nach 24 Stunden eine Reduktion der ungeschnittenen Form von ATF6 nachgewiesen werden sowie ein Anstieg der geschnittenen Form von Caspase 3. In Mikroglia kam es nach 4 und 6 Stunden zu einer Reduktion in der Expression von GRP78. Die Expression der jeweils anderen Proteine zeigte sich unbeeinflusst.

ATF6 steht am Anfang einer UPR-Signalkette. Im Zuge seiner Aktivierung wird es durch Proteasen geschnitten und es entsteht ein aktiver Transkriptionsfaktor. Die nachgewiesene Reduktion der ungeschnittenen Form ist also als Aktivierung von ATF6 zu werten. Als Transkriptionsfaktor führt ATF6 ebenso wie XBP1s zur Induktion von GRP78. Ein Anstieg der Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Gleichzeitig kommt es mit der Induktion von Caspase 3 zur Apoptose. Für dieses Ergebnis spricht auch der signifikante Zellzahlverlust in der Doppelfärbung.

Auffällig ist die späte Aktivierung von ATF6. Seine Aktivierung steht zu Beginn einer UPR Signalkette. So konnten andere Arbeitsgruppen bereits eine Reduktion der ungeschnittenen Form zwischen 2 und 6 Stunden nach Beginn der Schädigung nachweisen (Chen et al., 2004). Eher unwahrscheinlich erscheint die Möglichkeit, dass die induzierte Schädigung zu mild war und es in diesem Rahmen zu einer verzögerten Aktivierung kam. Da es in den Experimenten zu einer eindeutigen Induktion von Apoptose kommt, konnte durch die verwendete Konzentration 6-OHDA nachweislich eine potente Schädigung induziert werden. Denkbar wäre also eine unabhängige Aktivierung von ATF6 und Caspase 3. Die Funktion von ATF6 als Transkriptionsfaktor ist vielfach nachgewiesen (Yoshida et al., 1998). Eine darüberhinausgehende Funktion ist bisher jedoch nicht beschrieben. Nichtsdestotrotz scheint die Aktivierung von Caspase 3 mit nachfolgender Apoptose nicht ATF6 vermittelt zu sein. Dazwischenstehende Regulationsschritte wie z.B. die Induktion von CHOP bleiben aus. Diese Ergebnisse sprechen für die Induktion einer UPR-unabhängigen Apoptose durch 6-OHDA in murinen kortikalen Neuronen.

Dies könnte durch den Wirkmechanismus von 6-OHDA begründet sein. 6-OHDA führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wodurch oxidativer Stress entsteht und ER-Stress induziert wird. Über insgesamt drei verschiedene Mechanismen kann durch oxidativen Stress Apoptose induziert werden. Zunächst gibt es einen TNF- und Fas-Rezeptor vermittelten Signalweg über Aktivierung von Caspase 8 und einen mitochondrial vermittelten Signalweg über Aktivierung von Caspase 9 (Sinha et al., 2013). Schließlich gibt es noch den ER-abhängigen Signalweg über Aktivierung von Caspase 12 (Nakagawa et al., 2000). Caspase 3 wird im Rahmen aller Signalwege im exekutiven Teil der Apoptose aktiviert. Eine Zuordnung zu einem bestimmten Signalweg im Rahmen der Apoptose ist nicht mehr möglich. Die Induktion von Apoptose unter Umgehung von ER-Stress und UPR durch 6-OHDA wäre also möglich. Ebenso können mehrere vielleicht auch zeitlich versetzte Signalwege, welche zur Apoptose führen, induziert werden. Um eine genauere Differenzierung zu erlauben, könnte man die für ihren jeweiligen Signalweg spezifischen Caspasen bestimmen. Des Weiteren wäre es sicherlich interessant z.B. über Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration (H_2O_2) zu überprüfen, wann genau in den verwendeten Schädigungsmodellen ROS entstehen und ob eine verzögerte ER-Stress-Induktion hierdurch bedingt ist.

Die Induktion von ER-Stress in primären kortikalen Neuronen durch 6-OHDA ist also möglich, wie durch die Aktivierung von ATF6 deutlich wird. Die komplette Induktion aller UPR-Signalarmlen gelingt nicht. Darüber hinaus wird vermutlich eine ER-Stress-unabhängige Apoptose induziert.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass 6-OHDA sich als potenter ER-Stress-Induktor eignet. Chen und Kollegen gelang es in zerebellären granulären Rattenneuronen (englisch: *cerebellar granule neurons* (CGN)) GRP78 und CHOP zu induzieren. Verwendet wurde mit 50 μ M eine ähnliche Konzentration 6-OHDA (Chen et al., 2004). Unter der Annahme, dass 6-OHDA sich als ER-Stress-Induktor eignet, müssen Differenzen in der Regulation durch interexperimentelle Unterschiede bedingt sein. Der grundlegendste Unterschied besteht in den verwendeten Zelltypen bzw. deren Entwicklungsstand.

In mikroglialen Zellen ist hingegen eine Reduktion von GRP78 nach 4 und 6 Stunden zu verzeichnen. In der Positivkontrolle kommt es im Gegensatz dazu

zu einem Anstieg der Proteinexpression, welcher jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus liegt.

GRP78 ist in seiner Funktion als Chaperon antiapoptotisch und wird in vielen Studien als eine Art Markerprotein für ER-Stress und UPR verwendet (Bellucci et al., 2011), da zahlreiche *In vitro* Studien ergeben haben, dass es durch ER-Stress zu einer vermehrten Expression von GRP78 kommt (Chen et al., 2004; Zeng et al., 2014). Die Reduktion von GRP78 unter ER-Stress-Bedingungen konnte bislang von anderen Arbeitsgruppen noch nicht gezeigt werden. Insgesamt haben sich erst wenige Arbeiten mit ER-Stress in Mikrogliazellen beschäftigt. Es konnte jedoch eine erhöhte Expression von GRP78 in humanen Mikroglia nach Rückenmarksverletzungen gezeigt werden (Fan et al., 2015), ebenso gelang es einer weiteren Arbeitsgruppe in primären murinen Mikroglia durch A β 25-35 ER-Stress zu induzieren und erhöhte GRP78 Konzentrationen nachzuweisen (Xie et al., 2017). Eine veröffentlichte Studie zu kokaininduziertem ER-Stress an BV2-Zellen verdeutlicht, dass auch in Mikrogliazellen die Induktion von ER-Stress und konsekutiver UPR-Aktivierung möglich ist (Costa et al., 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass es durch Inkubation mit 6-OHDA nicht zu Zellzahlverlust und Apoptose in Mikroglia kommt, sondern lediglich zu einer Einschränkung der Viabilität.

Unter Berücksichtigung der veröffentlichten Literatur ist die reduzierte Expression von GRP78 eher nicht als UPR-Aktivierung im Rahmen von ER-Stress zu werten. Auch eine verringerte Proteinexpression bzw. ein verstärkter Abbau in Folge einer erhöhten Apoptose scheint bei ausschließlicher Viabilitätseinschränkung unwahrscheinlich. Die veränderte Proteinexpression kann im Gegensatz dazu durch reduzierten ER-Stress und eine verringerte UPR bedingt sein. 6-OHDA eignet sich daher nicht, um in den hier verwendeten murinen mikroglialen Zellen ER-Stress zu induzieren.

Besonders auffällig ist die stark differierende Reaktion zwischen Neuronen und Mikroglia auf einen schädigenden Stimulus mit der gleichen schädigenden Substanz. Neurone reagieren mit ER-Stress-Aktivierung durch Prozessierung von ATF6. Mikroglia reagieren mit verminderter ER-Stress-Aktivität und sinkender GRP78-Expression. Möglicherweise liegt die Erklärung in den verschiedenen Funktionen, welche verschiedene Zellen ausüben. Mikrogliale Zellen reagieren

auf eine Schädigung mit Aktivierung und Proliferation (Pan et al., 2011). Neurone reagieren hingegen mit Zelltod. Dies lässt sich auch in einem murinen PD-Modell nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA beobachten, in dem durch 6-OHDA neuronaler Zelltod und mikrogliale Aktivierung induziert werden (Simola et al., 2007). Verschiedene Reaktionen auf eine zelluläre Schädigung können auch verbunden sein mit Differenzen in der zellulären Regulation des Schädigungsprozesses.

7.1.2 Einfluss des Entwicklungsstandes auf die Regulation von ER-Stress

Nach derzeitigem Wissen kommt es im Zuge von ER-Stress zu einer Aktivierung aller drei Signalarmlen der UPR (Schroder et al., 2005). Tatsächlich gelang es anderen Arbeitsgruppen in experimentellen Studien zur PD Änderungen der Expression in den von uns getesteten Proteinen nachzuweisen. Bellucci und Kollegen konnten zeigen, dass durch α -Synuklein in SH-SY5Y-Zellen GRP78 induziert wird (Bellucci et al., 2011). In PC12-Zellen, welche eine genetisch veränderte Form von α -Synuklein (A53T) produzieren, wurde eine verstärkte Expression von CHOP und Caspase 3 nachgewiesen (Smith et al., 2005) und in einem Zellkulturmodell mit SH-SY5Y-Zellen konnte durch 6-OHDA eine Reduktion von ATF6 erzielt werden (Yamamuro et al., 2006).

Im Gegensatz dazu zeigen veröffentlichte Studien zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen, dass es auch hier nur zur teilweisen Expressionsänderung der untersuchten UPR-Proteine kommen kann. Lee und Kollegen veröffentlichten eine Studie, in welcher in kortikalen Neuronen von AD-Patienten ein Anstieg von CHOP und Caspase 3 verzeichnet wurde, die Expression von GRP78 aber konstant blieb (Lee et al., 2010).

Zuvor wurde bereits diskutiert, dass es interzelluläre Unterschiede gibt, welche zu einer veränderten Aktivierung von ER-Stress auf einen schädigenden Reiz führen können. Weiterhin fällt auf, dass es nach gelungener ER-Stress-Induktion nicht zur konstanten Aktivierung aller UPR-Signalarmlen kommt. Die Frage, wie dies in einem stereotypen System möglich ist, stellt sich zwangsläufig und soll im Folgenden diskutiert werden.

In den ersten Studien zu ER-Stress und UPR ging man von einem hochkonserviertem Mechanismus von der Hefezelle bis zur Säugetierzelle aus (Shamu et al., 2016). In Säugetierzellen konnten jedoch zusätzliche regulative Mechanismen wie das *Endoplasmic Reticulum Stress Element (ERSE) -like Element* (Yoshida et al., 1998) nachgewiesen werden. Weitere, bisher nicht beschriebene Unterschiede in der Regulation von ER-Stress in einem ehemals für hochkonserviert gehaltenem System können nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Zu hohe Konzentrationen von 6-OHDA induzieren eine zu starke Schädigung, welche eine aktive Gegenregulation mittels ER-Stress und UPR nicht mehr zulässt. Die Aussagekraft der Experimente wäre damit limitiert. Zur Vermeidung dieses Effektes wurden im Vorfeld Versuche zur Konzentrationsfindung durchgeführt (siehe 6.1), in welchen eine Konzentration gefunden wurde, die lediglich eine milde Schädigung induziert ohne ausgeprägten Zellzahlverlust. Andere Arbeitsgruppen verwendeten ähnliche oder höhere Konzentrationen von 6-OHDA zur Induktion von ER-Stress (Yamamuro et al., 2006). Auch die späten und gleichzeitigen Änderungen der Expression von ATF6 und Caspase 3 sprechen eher gegen eine sofortige Apoptose nach dem schädigenden Stimulus.

Darüber hinaus ist bekannt, dass Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien die Expression von Genen aktiv beeinflussen können. Im Rahmen epigenetischer Mechanismen werden einzelne Nukleinsäuren methyliert, sodass es in Folge nicht zur Transkription und Translation des entsprechenden Genes kommt (Zilliken, 1967). Die Expression des Genes wird so unterdrückt. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine weisen aber überwiegend eine konstante Expression auf. Diese Ergebnisse sprechen gegen übergeordnete epigenetische Regulationsmechanismen. Lediglich für die fehlende Expression von CHOP in Mikroglia wären epigenetische Regulationsmechanismen ein Erklärungsansatz.

Eine weitere Erklärung für die unvollständige UPR-Aktivierung liegt im Entwicklungsstand der verwendeten Zellen begründet. In der embryonalen Entwicklung ist das Gehirn jenes Organ, welches sich bis nach der Geburt differenziert. Diese Differenzierung betrifft nicht nur die morphologische Gestalt des Organs, sondern auch dessen Funktion. So gibt es beispielsweise Phasen

von Proliferation und Wachstum in der embryonalen Entwicklung aber auch von Apoptose ungenutzter Bereiche (Trepel, 2008). Für diese Überlegung spricht auch die Beobachtung, dass sich in murinen Mikroglia eine Expression von CHOP nicht nachweisen ließ. Um Fehler in der Durchführung des Western Blots oder mangelnde Bindungskapazitäten des Antikörpers auszuschließen, wurde eine Positivkontrolle verwendet, bestehend aus unbehandelten kortikalen Neuronen, in denen der Nachweis von CHOP zuvor möglich war. Um eine sehr geringe Expression von CHOP in Mikroglia nicht zu übersehen, wurden z.T. sehr hohe Proteinkonzentrationen bis 60 µg im Blotverfahren aufgetragen. Trotz dieser Maßnahmen gelang es nicht, CHOP in Mikroglia nachzuweisen. Es wäre möglich, dass CHOP in mikroglialen Zellen grundsätzlich nicht exprimiert wird. Mhaille und Kollegen gelang es, in einem *in vivo* Modell zu zeigen, dass CHOP von adulten humanen Mikroglia *post-mortem* exprimiert wird (Mhaille et al., 2008). Ebenso konnte in adulten murinen Mikroglia isoliert aus p53-defizienten Mäusen CHOP nachgewiesen werden (Kawahara et al., 2001). Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass in murinen mikroglialen Zellen an diesem Punkt ihrer Entwicklung CHOP nicht exprimiert wird.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse und auch der z.T. widersprüchlichen Ergebnisse in der veröffentlichten Literatur scheint es anders als vielleicht erwartet, im Rahmen von ER-Stress nicht zu einer stereotypen Aktivierung von UPR-Signalwegen zu kommen. Vielmehr sollte man die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass die Aktivierung aufgrund verschiedener Ergebnisse zwischen Neuronen und Mikroglia nicht nur stark vom untersuchten Zelltyp, sondern auch von dem Entwicklungsstand der verwendeten Zellen abhängt. Eine unvollständige Aktivierung von ER-Stress und UPR wäre somit dem unreifen Entwicklungsstand der Zellen geschuldet. Darüber hinaus legen die Differenzen zwischen veröffentlichten Studien an adulten Zellen zu den hier gewonnenen Ergebnissen an embryonalen Zellen die Vermutung nahe, dass es eine altersabhängige Anpassung in der Regulation von ER-Stress und UPR gibt. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass Mikroglia je nach Hirnregion eine geänderte Proteinexpression sowie verschiedene Phänotypen aufweisen können (de Haas et al., 2008) und das sich diese im Alterungsprozess ändern (VanGuilder et al., 2011).

Diese These hätte in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen weitreichende Folgen. Bei Berücksichtigung dieser Überlegung lassen sich bereits gewonnene Ergebnisse zu ER-Stress neu bewerten. Die Testung einzelner UPR-Proteine eignet sich möglicherweise nicht, um Aussagen über die Aktivität von ER-Stress in der Zelle zu treffen. Durch kombinierte und gezielte Testung verschiedener Proteine ließe sich eine sichere Aussage über den Aktivitätszustand von ER-Stress in der untersuchten Zelle treffen.

Neurodegenerative Erkrankungen sind, wie in der Einleitung beschrieben, Erkrankungen des alternden Menschen. Erkenntnisse aus Zellkulturmodellen, insbesondere embryonalen Modellen, ließen sich daher stets nur unter Vorbehalt anwenden. Auch die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen könnte durch eine altersabhängige Expression zellulärer Proteine beeinflusst sein. Besonders die Entwicklung medikamentöser Therapien, welche gezielt intrazelluläre Regulationen beeinflussen sollen, müssen vor dem Hintergrund einer gealterten Proteinexpression entwickelt werden, um ihre maximale therapeutische Wirkung zu entfalten.

7.1.3 6-Hydroxydopamin kann murine mikrogliale Zellen nicht aktivieren

Aus dem Schädigungsmodell von 6-OHDA und Mikroglia geht hervor, dass durch 6-OHDA eine suffiziente Schädigung induziert werden kann. Eine gleichzeitige Aktivierung, messbar in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sowie NO konnte jedoch nicht erzielt werden.

Toxische Substanzen haben auf Mikroglia nicht nur einen schädigenden Einfluss, sondern bewirken häufig eine Aktivierung mit konsekutiver inflammatorischer Reaktion (Li et al., 1996; Yan et al., 2015). Yan und Kollegen konnten darüber hinaus zeigen, dass durch 6-OHDA eine Aktivierung mikroglialer Zellen möglich ist. In dieser Publikation wurden primäre kortikale Mikroglia aus Rattengehirnen an Tag 1 postnatal verwendet sowie eine Konzentration von 100 μ M 6-OHDA (Yan et al., 2015).

Die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen in Mikroglia ist NF κ B-vermittelt (Pahl et al., 1995) und geschieht im Rahmen von ER-Stress unter anderem über den IRE1 α -Signalweg (Miani et al., 2012), über den auch die

Expression von GRP78 induziert wird. Nach Inkubation mit 6-OHDA fand sich jedoch kein Anstieg in der Expression von GRP78 sondern im Gegensatz dazu eine Reduktion. Andere Proteine der UPR waren nicht nachweisbar oder 6-OHDA hatte keinen Einfluss auf die Expression, die Aktivierung der Zellen gelang im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen nicht. Die Interpretation der Ergebnisse legt nahe, dass es nicht gelang, den IRE1 α -Signalweg zu induzieren. Dies könnte die fehlende Aktivierung der mikroglialen Zellen erklären. Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Wirkungsweise von 6-OHDA. Mikroglia besitzen sowohl adrenerge (Mori et al., 2002) als auch dopaminerge Rezeptoren (Farber et al., 2005). 6-OHDA kann als Strukturanalogon dieser Transmitter an die Rezeptoren binden. Die Aktivierung von adrenergen Rezeptoren verringert wiederum die Ausschüttung von TNF- α und IL-6 sowie NO. Auch die Aktivierung von dopaminergen Rezeptoren führt zu verringerter Ausschüttung von NO (Farber et al., 2005). Die durch 6-OHDA nicht induzierbare Aktivierung wäre damit erklärbar.

7.2 Das Amyloid-beta 1-42 Schädigungsmodell

Die Versuche mit A β 1-42 in primären kortikalen Neuronen und mesenzephalen Mikroglia haben ergeben, dass durch A β 1-42 eine potente Schädigung in beiden Zelltypen induziert werden kann, ohne jedoch zu einer gleichzeitigen Aktivierung der Mikroglia zu führen. Eine geänderte Proteinexpression in neuronalen Zellen konnte nicht induziert werden, hier hatte die Behandlung mit A β 1-42 keinen Einfluss auf die Expression der getesteten Proteine. In mikroglialen Zellen kam es nach Inkubation mit A β 1-42 für 4, 6 und 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression von GRP78. Im Gegensatz dazu konnte in der Positivkontrolle ein Anstieg der Expression verzeichnet werden. Entsprechend den Versuchen mit 6-OHDA in mikroglialen Zellen konnte auch hier CHOP nicht nachgewiesen werden. In diesem Teil der Diskussion soll nicht erneut darauf eingegangen werden (siehe 7.1.2).

7.2.1 Amyloid-beta1-42 führt nicht zur Induktion von ER-Stress in kortikalen Neuronen

Durch die Inkubation mit A β 1-42 konnte in neuronalen Zellen keine signifikante Änderung der Proteinexpression nachgewiesen werden. Der Nachweis einer signifikanten Einschränkung der Viabilität war jedoch möglich. Bei nicht nachweisbarer Änderung der Proteinexpression muss von einer fehlenden oder subklinischen Aktivierung von ER-Stress ausgegangen werden.

In der veröffentlichten Literatur gibt es jedoch Beispiele dafür, dass durch Amyloid-beta eine Aktivierung von ER-Stress möglich ist. Im Unterschied wurde von dieser Arbeitsgruppe eine andere Form des Amyloid-betas verwandt, Amyloid-beta1-40 (A β 1-40), ebenso wie eine andere Zellart. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um eine Zelllinie aus Endothelzellen der Ratte (RBE4-Zellen, englisch: *rat brain endothelial cells*). Die verwendeten Amyloid-beta Konzentrationen lagen zwischen 0,1 μ M und 2,5 μ M (Fonseca et al., 2013).

Aufgrund ähnlicher toxischer Eigenschaften des A β 1-42, ebenso wie ähnlicher verwendeter Konzentrationen wäre eine Induktion von ER-Stress durch Inkubation mit A β 1-42 durchaus denkbar gewesen. Im Gegensatz hierzu verwendete eine weitere Arbeitsgruppe ebenfalls A β 1-42 Peptide in SK-N-SH-Zellen und konnte nach Testung mehrerer Alterungsprozesse lediglich mit einer gealterten Form des A β 1-42, welches für 1 Woche bei 4°C inkubiert wurde, eine suffiziente ER-Stress-Induktion erzielen (Lee et al., 2010). Ein Einfluss der Oligomerisierungsmethode des A β 1-42 auf dessen Fähigkeit ER-Stress zu induzieren wäre demnach denkbar.

Eine Reduktion der neuronalen Zellzahl in der Doppelfärbung konnte selbst durch den Einsatz hoher Konzentrationen A β 1-42 nicht erreicht werden. *In vivo* und *in vitro* Studien belegen jedoch eine neurotoxische Wirkung von A β 1-42 (Chong et al., 2006; Jonson et al., 2015; Liu et al., 2015). Eine Reduktion der Zellzahl wäre daher auch in unserem Modell zu erwarten gewesen. Der fehlenden Zellzahlreduktion bei eingeschränkter Viabilität können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen.

Zunächst ist die reduzierte Viabilität im MTT-Test nicht ohne Vorbehalt zu interpretieren. Das MTT-Reagenz besitzt selbst eine zytotoxische Wirkung, was sich durch eine verminderte MTT-Reduktion bei längerer Inkubationsdauer

bemerkbar macht (Riss et al., 2004). Zudem inhibiert A β die intrazelluläre MTT-Reduktion und führt zu einer vermehrten Exozytose von Formazan-Produkten. Der Umfang der Exozytose ist jedoch an das Ausmaß der Zytotoxizität gebunden (Liu et al., 1997). Daher ist der MTT-Assay nach wie vor ein weitläufig genutztes Verfahren um die Zelltoxizität von A β 1-42 zu messen (Ronicke et al., 2008).

Für die Herstellung von A β 1-42 Oligomeren gibt es verschiedene Protokolle. Es wäre denkbar, dass das genutzte Protokoll nicht suffizient toxische Oligomere erzeugt. Veröffentlichungen zeigen, dass das verwendete Protokoll verlässlich toxische Oligomere erzeugt (Chong et al., 2006). Fehler in der Durchführung wurden versucht durch stichprobenartige Überprüfung der Oligomerisierung im Silbergel zu minimieren. Wie jedoch im Abschnitt zuvor erläutert, konnte eine andere Arbeitsgruppe je nach Alterungsprozess Differenzen in der Kapazität des A β zur Induktion von ER-Stress herausarbeiten (Lee et al., 2010). Denkbar wären demnach auch Unterschiede in der Toxizität.

Die Differenz zwischen Viabilität und Zellzahl kann auch aus der Wahl des Zelltyps resultieren. Die Toxizität von A β 1-42 auf humane Zellen lässt sich nicht ohne Weiteres auf murine Zellen übertragen. Darüber hinaus können sich embryonale Zellen in einem anderen physiologischen Zustand als adulte Zellen befinden. Zumindest für Mikroglia ist, wie zuvor beschrieben, je nach Alter und Lokalisation eine an den physiologischen Zustand angepasste Proteinexpression beschrieben (de Haas et al., 2008; VanGuilder et al., 2011). Ein verändertes Muster der Proteinexpression oder der Membranbeschaffenheit könnte so die Toxizität von A β 1-42 beeinflussen.

Schlussendlich ist auch die Durchführung des Experimentes stark untersucherabhängig. Durch manuelles Zählen der Zellen sind Schwankungen möglich, welche nur durch wiederholtes Durchführen und genaue Festlegung des Bildausschnittes reduziert werden können.

Da im MTT-Test eine deutliche Reduktion der Viabilität gezeigt werden konnte, ist von einer toxischen Wirkung des A β 1-42 auszugehen. Basierend auf dieser Annahme kann wie bereits im 6-OHDA-Schädigungsmodell von einer veränderten Reaktion auf toxische Stimuli ausgegangen werden. Analog zu diesem Modell und dem verwendeten Zelltyp kann ebenfalls die Schlussfolgerung

gezogen werden, dass dieses durch den Entwicklungsstand der Zelle bedingt sein könnte.

Diese Erkenntnis ist besonders interessant. Toxische Amyloid-beta Oligomere gehören zu den zentralen Elementen in der Entstehungshypothese der AD. Wenn diese in embryonalen Zellen einen geringeren toxischen Effekt besitzen und auch eine veränderte ER-Stress-Regulation besitzen, spricht dies für eine erhöhte Anfälligkeit gealterter Zellen für schädigende Noxen. Resultierend in einer konsekutiven Apoptose gealterter Zellen passt diese Überlegung zur Pathogenese der AD, welche sich in Menschen höheren Lebensalters manifestiert.

7.2.2 Amyloid-beta1-42 eignet sich nicht als ER-Stressor in mikroglialen Zellen

Wie zuvor zusammengefasst, kommt es durch A β 1-42 in Mikroglia zu einer Reduktion von GRP78 nach 2, 4, 6 und 24 Stunden. In der Positivkontrolle kommt es im Gegensatz dazu zu einem signifikanten Anstieg von GRP78. Ein Nachweis von CHOP war nicht möglich.

Die Ergebnisse des A β 1-42-Schädigungsmodells sind damit annähernd identisch zu den Ergebnissen des mikroglialen 6-OHDA-Modells und verifizieren diese somit zum Teil. Analog zu diesem Modell ist die Reduktion von GRP78 jedoch eher nicht im Rahmen von ER-Stress zu werten. Dies wird v.a. deutlich vor dem Hintergrund eines signifikanten Anstiegs der Expression in der Positivkontrolle.

Die signifikante Induktion von GRP78 macht deutlich, dass potenziell eine Induktion von ER-Stress in Mikrogliazellen möglich ist, durch A β 1-42 und 6-OHDA jedoch nicht gelingt. Auch wenn beide Substanzen sich bereits als ER-Stress-Induktoren bewiesen haben, scheint die Verwendung von 6-OHDA oder A β 1-42 in mikroglialen Zellen zur Induktion von ER-Stress weniger praktikabel.

Die Induktion proinflammatorischer Zytokine und NO konnte ebenfalls nicht induziert werden. Auch Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe mit höheren Konzentrationen von A β 1-42 konnten nicht zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in diesem Zellkulturmodell führen (Gold et al., 2013). Verschiedene Publikationen zeigen, dass A β 1-42 in der Lage ist, die Ausschüttung

von Zytokinen zu induzieren (Goodwin et al., 1997; Pan et al., 2011). Verwendet wurden hier lösliche A β 1-42 Oligomere in murinen primären kortikalen Mikroglia, gewonnen postnatal an Tag 1.

Insgesamt ist dieses Ergebnis jedoch unerwartet. Fibrilläres und oligomerisiertes A β führt über multiple Rezeptoren zur Aktivierung von Mikroglia und Sezernierung proinflammatorischer Enzyme sowie reaktiver Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species* (ROS)) und Chemokine. Eine wesentliche Rolle spielen in diesem Mechanismus die CD36- und TLR-vermittelte Inflammation. (Bamberger et al., 2003; El Khoury et al., 2003; Stewart et al., 2010; Terrill-Usery et al., 2014).

7.3 Fazit

Es erfolgte die Etablierung vier verschiedener Schädigungsmodelle, mit deren Hilfe ER-Stress untersucht wurde. Im neuronalen 6-OHDA-Schädigungsmodell konnte ER-Stress induziert werden, jedoch gelang es nicht, alle Signalarmede der UPR zu aktivieren. Im neuronalen A β 1-42-Schädigungsmodell gelang es nicht, ER-Stress zu induzieren. In beiden mikroglialen Schädigungsmodellen konnte eine veränderte Expression von Proteinen der UPR nachgewiesen werden. Nach sorgfältiger Diskussion der Ergebnisse ist diese jedoch eher nicht im Rahmen von ER-Stress zu sehen (siehe Abbildung 22).

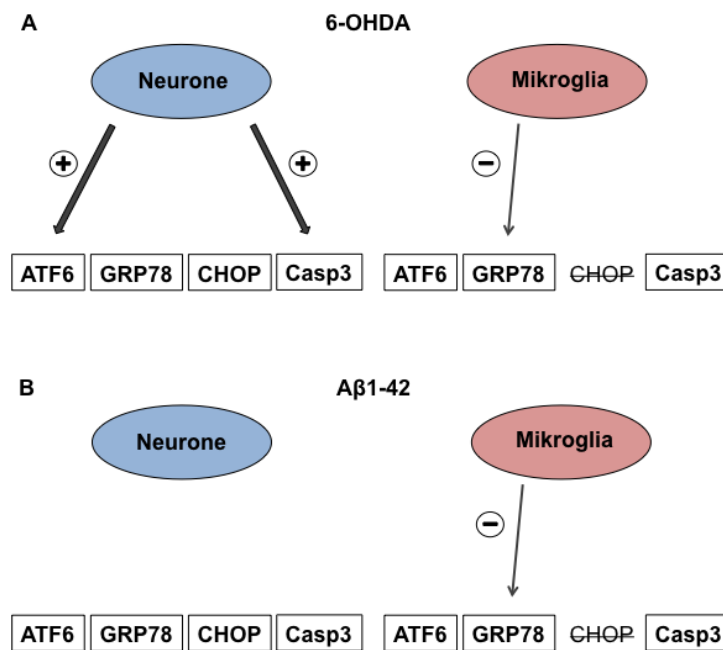


Abbildung 22: Ergebnisse der Schädigungsmodelle.

A Schematische Darstellung der Ergebnisse des neuronalen und mikroglialen 6-OHDA Schädigungsmodells. 6-OHDA induziert ATF6 und Caspase 3 in neuronalen Zellen, in Mikroglia führt es zur reduzierten Expression von GRP78. CHOP war nicht nachweisbar.

B Schematische Darstellung der Ergebnisse des neuronalen und mikroglialen Aβ1-42 Schädigungsmodells. Aβ1-42 führt nicht zu einer Induktion von ER-Stress in neuronalen Zellen, in Mikroglia führt es zu einer reduzierten Expression von GRP78. CHOP war nicht nachweisbar.

Quelle: Eigene Abbildung

Die zeitliche Abfolge der UPR-Aktivierung, welche im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte, lässt sich bei stark eingeschränkter Aktivierung der verschiedenen untersuchten Proteine nur schwer beurteilen. Ein generelles Muster der Aktivierung konnte nicht aufgezeigt werden.

In den mikroglialen 6-OHDA und Aβ1-42 Schädigungsmodellen konnte keine Aktivierung der Zellen und kein ER-Stress induziert werden. Trotzdem gibt es Evidenz dafür, dass ER-Stress und UPR auch in Mikroglia aktiv sind. Diese Informationen stammen aus der Forschung an *post-mortem* Gewebe von Enzephalomyelitis Disseminata (ED)-Patienten. In inflammatorischen Läsionen konnte eine erhöhte Expression von Proteinen der UPR in Mikroglia nachgewiesen werden (Mhaille et al., 2008; Ni Fhlathartaigh et al., 2013). Auch in BV2-Zellen konnte durch Exposition mit Kokain eine Induktion verschiedener UPR-Proteine induziert werden (Costa et al., 2013). Zudem gibt es Evidenz dafür,

dass sowohl 6-OHDA als auch A β 1-42 Inflammation induzieren können (Pan et al., 2011; Yan et al., 2015).

Intrathekale Injektionen von 6-OHDA im Tiermodell führen zum Verlust dopaminergischer Neurone sowie zur Aktivierung von Mikrogliazellen. Es gibt Autoren, welche die Aktivierung von Mikrogliazellen als sekundären Prozess in Folge der Neurodegeneration betrachten (Henry et al., 2009). Andere Autoren fanden jedoch Hinweise dafür, dass die Aktivierung von mikroglialen Zellen dem neuronalen Zelltod vorausgeht (Marinova-Mutafchieva et al., 2009). Vor dem Hintergrund dieser Informationen, einer mikroglialen Aktivierung zu Beginn des neuronalen Zellverlustes, dem Nachweis mikroglialen ER-Stresses und UPR in neurodegenerativen Erkrankungen sowie bekannter inflammatorischer Signalwege im Rahmen von ER-Stress und UPR (siehe 3.6) ist eine kausale Beteiligung von ER-Stress an Neuroinflammation nicht auszuschließen.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse eignen sich die hier etablierten Modelle nicht zur generellen Untersuchung von ER-Stress. Die inkomplette UPR-Aktivierung in den untersuchten murinen Zellen macht es schwierig, Ergebnisse auf adulte humane Zellen zu übertragen, in denen ein anderes UPR-Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch trotzdem interessante Schlussfolgerungen zu und haben einen tieferen Einblick in ER-Stress-Regulation erlaubt. Es konnten starke Unterschiede in der Expression und der Reaktion auf ähnliche toxische Stimuli zwischen den hier verwendeten embryonalen Zellen und den gealterten Zellen in der veröffentlichten Literatur nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass ER-Stress und UPR je nach Zellalter möglicherweise einer veränderten Regulation unterliegen. Konsekutiv führt dies auch zu einer veränderten Anfälligkeit gegenüber Noxen.

Insbesondere in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen sollte dies beachtet werden. Charakteristisches Merkmal der AD ebenso wie der PD ist die Manifestation im höheren Lebensalter. In der Übertragung von *in vitro* gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen sollten nicht nur bekannte Problematiken wie Differenzen zwischen verschiedenen Spezies, Milieuunterschiede durch Verwendung von Monokulturen etc. berücksichtigt werden. Auch die Idee, dass altersabhängige Differenzen an Regulationsprozessen zu berücksichtigen sind, sollte Einzug halten.

7.4 Ausblick

Die Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung sind die großen medizinischen Herausforderungen unserer Zeit. Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung wächst der Druck zur Entwicklung neuer Therapiestrategien zusehends. Die Erforschung von ER-Stress und UPR bietet auf diesem Gebiet besonders viel Potenzial. Da ER-Stress und UPR aktiv sind, bevor es zum Tod der Zellen kommt bzw. sie diesen initiieren, ist die Entwicklung von Stress-modulierenden Medikamenten besonders interessant. Es gibt bereits einige vielversprechende Ansätze auf diesem Gebiet. Zonisamid ist ein bekanntes Antikonvulsivum, welches die Expression von CHOP und die Aktivierung von Caspase 3 supprimiert und somit zur Reduktion von neuronalen Zellschäden und -tod führt (Tsujii et al., 2015). Auch der Einfluss diätetischer Maßnahmen und traditioneller Heilmittel auf die Regulation von ER-Stress ist zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt, ebenso wie deren antioxidative Wirkung und Kapazität zur Reduktion von Inflammation. Docosahexaensäure, ein Mikroalgenbestandteil, reduziert z.B. ER-Stress und führt darüber hinaus zur Reduktion von akkumuliertem Tau und APP (Begum et al., 2014). Tyrosol ist eine Phenolsäure, welche v.a. in Olivenöl vorkommt. Durch die Behandlung mit Tyrosol konnte eine Reduktion von ER-Stress erzielt sowie ein vermehrter Verlust von β -Zellen vermieden werden (Lee et al., 2016). In Experimenten mit Wogonin, einem Flavonoid aus der Wurzel des Baikal Helmkrautes, konnte außer einer reduzierten ER-Stress Aktivität auch ein verminderter neuronaler Zelltod nachgewiesen werden (Xu et al., 2015) und nicht zuletzt konnte durch Ilexgenin A, ein natürlich vorkommendes Triterpenoid, außer einer reduzierten ER-Stress-Aktivität auch eine verminderte NLRP3 Inflammasom-Aktivität verzeichnet werden (Li et al., 2015).

ER-Stress-Modelle, wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, bilden die Grundlage für die weitere Erforschung. Die hier etablierten Modelle eignen sich a.e. aufgrund der Unreife der verwendeten Zellen nicht zur weiteren Erforschung von ER-Stress in neurodegenerativen Erkrankungen, welche durch ein hohes Erkrankungsalter gekennzeichnet sind. Die Hervorhebung eines möglichen Regulationsunterschiedes bedingt durch den Entwicklungsstand der verwendeten Zellen ist vor dem Hintergrund langer präklinischer intrazerebraler Veränderungen besonders interessant und sollte, sofern bestätigt, in beste-

hende Theorien zur Genese der Erkrankungen eingearbeitet werden. Zur Sicherung dieser Erkenntnisse wären weitere Versuche wünschenswert. Hier wäre ein analoger Versuchsaufbau in adulten Zellen und Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit denen in embryonalen Zellen zielführend. Der einzige experimentelle Unterschied sollte im Alter der verwendeten Zellen liegen. Bei gesicherten Differenzen in embryonalen und adulten Zellen sind weiterführende Experimente mit gemischten Zellkulturen oder im Tiermodell, in welchen physiologischere Umgebungsbedingungen herrschen als in Monokulturen, sicherlich interessant.

8 Literaturverzeichnis

- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holzmann, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B., Phelps, C. H. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 2011;7(3), 270-279. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008
- Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychiatrisch-gerichtliche Medizin*. 1907;64, 146-148
- Alzheimer Europe, 2013. abgerufen von <https://www.alzheimer-europe.org/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe>, abgerufen am 01.01.2019
- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., Van Hoesen, G. W. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 1991;1(1), 103-116.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1992;42(3 Pt 1), 631-639.
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., Mook-Jung, I. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid beta in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 2016;64(12), 2274-2290, doi:10.1002/glia.23074
- Bamberger, M. E., Harris, M. E., McDonald, D. R., Husemann, J., Landreth, G. E. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, 2003;23(7), 2665-2674.
- Bassik, M. C., Scorrano, L., Oakes, S. A., Pozzan, T., Korsmeyer, S. J. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *Embo j*, 2004;23(5), 1207-1216. doi:10.1038/sj.emboj.7600104
- Begum, G., Yan, H. Q., Li, L., Singh, A., Dixon, C. E., Sun, D. Docosahexaenoic acid reduces ER stress and abnormal protein accumulation and improves neuronal function following traumatic brain injury. *J Neurosci*, 2014;34(10), 3743-3755. doi:10.1523/jneurosci.2872-13.2014
- Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., Sigala, S., Battistin, L., Spillantini, M., Missale, C., Spano, P. Induction of the unfolded protein response by alpha-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2011;116(4), 588-605. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07143.x
- Bendor, J. T., Logan, T. P., Edwards, R. H. The function of alpha-synuclein. *Neuron*, 2013;79(6), 1044-1066. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000;2(6), 326-332. doi:10.1038/35014014
- Bickel, H. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. abgerufen von <https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1>

- [_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf](#), 2018, abgerufen am 01.01.2019
- Bierer, L. M., Hof, P. R., Purohit, D. P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K. L., Perl, D. P. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 1995;52(1), 81-88.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., Bistoni, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*, 1990;27(2-3), 229-237
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 2010;6(3) 131-44. doi:10.1038/nrneurol.2010.4
- Block, M. L., Zecca, L., Hong, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 2007;8(1), 57-69. doi:10.1038/nrn2038
- Blum-Degen, D., Muller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., Riederer, P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, 1995;202(1-2), 17-20
- Braak, H., Braak, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 1991;82(4), 239-259
- Braak, H., Braak, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 1997;18(4), 351-357
- Braak, H., Del Tredici, K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2009;201, 1-119
- Braak, H., Del Tredici, K. Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2010;78(1), 2-4. doi:10.1055/s-0029-1245179
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2003;24(2), 197-211
- Bradshaw, E. M., Chibnik, L. B., Keenan, B. T., Ottoboni, L., Raj, T., Tang, A., Rosenkrantz, L. L., Imboywa, S., Lee, M., Von Korff, A., Morris, M. C., Evans, D. A., Johnso, K., Sperling, R. A., Schneider, J. A., Bennett, D. A., De Jager, P. L. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci*, 2013;16(7), 848-850. doi:10.1038/nn.3435
- Bratton, A. C., Marshall E. K., Hendrickson J. A new coupling Component for Sulfanilamide Determination. *J Biol Chem*, 1939;128:537
- Cagnin, A., Brooks, D. J., Kennedy, A. M., Gunn, R. N., Myers, R., Turkheimer, F. E., Jones, T., Banati, R. B. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet*, 2001;358(9280), 461-467
doi:10.1016/s0140-6736(01)05625-2
- Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. G., Peterson, P. K. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*, 1992;149(8), 2736-2741
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 2006;5(3), 235-245. doi:10.1016/s1474-4422(06)70373-8
- Chen, G., Bower, K. A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C. J., Luo, J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *Faseb j*, 2004;18(10), 1162-1164.
doi:10.1096/fj.04-1551fje

- Chong, Y. H., Shin, Y. J., Lee, E. O., Kaye, R., Glabe, C. G., Tenner, A. J. ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem*, 2006;281(29), 20315-20325. doi:10.1074/jbc.M601016200
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., Bonuccelli, U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci*, 2011;32(2), 275-279. doi:10.1007/s10072-010-0454-7
- Clarke, J. R., Lyra, E. S. N. M., Figueiredo, C. P., Frozza, R. L., Ledo, J. H., Beckman, D., Katashima, C. K., Razolli, D., Carvalho, B. M., Frazao, R., Silveira, M. A., Ribeiro, F. C., Bomfim, T. R., Neves, F. S., Klein, W. L., Medeiros, R., LaFerla, F. M., Carnevali, J. B., Saad, M. J., Munoz, D. P., Velloso, L. A., Ferreira, S. T., De Felice, F. G. Alzheimer-associated Abeta oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med*, 2015;7(2), 190-210. doi:10.15252/emmm.201404183
- Cohen, G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 1984;5(1), 77-82.
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., Labaer, J., Rochet, J. C., Bonini, J. M., Lindquist, S. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 2006;313(5785), 324-328. doi:10.1126/science.1129462
- Corrigan, F., Vink, R., Blumbergs, P., Masters, C., Cappai, R., van den Heuvel, C. sAPP α rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 2012;122(1), 208-220. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07761.x.
- Costa, B. M., Yao, H., Yang, L., Buch, S. Role of endoplasmic reticulum (ER) stress in cocaine-induced microglial cell death. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013;8(3), 705-714. doi:10.1007/s11481-013-9438-8
- Cras, P., Kawai, M., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B., Perry, G. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991;88(17), 7552-7556.
- de Haas, A. H., Boddeke, H. W., Biber, K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, 2008;56(8), 888-894. doi:10.1002/glia.20663
- de Lau, L. M., Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2006;5(6), 525-535. doi:10.1016/s1474-4422(06)70471-9
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P., Ron, D. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 2004;24(23), 10161-10168. doi:10.1128/mcb.24.23.10161-10168.2004
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S3-Leitlinie Demenzen. 2016, abgerufen von https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-013l_S3-Demenzen-2016-07.pdf, abgerufen am 03.01.2019
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Phase-III-Studien zu Aducanumab, einem vielversprechenden Alzheimermedikament, abgebrochen . 2019, abgerufen von

- https://www.dgn.org/images/red_pressemitteilungen/2019/190322_PM_A_ducanumab.docx.pdf, abgerufen am 08.08.2019
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom. 2016; abgerufen von https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-010I_S3_Parkinson_Syndrome_Idiopathisch_2016-06.pdf, abgerufen am 12.02.2019
- Dickson, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2018;46(1), 30-33. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.07.033
- DJ, S. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1991;6(4), 487-498.
- Dobbs, R. J., Charlett, A., Purkiss, A. G., Dobbs, S. M., Weller, C., Peterson, D. W. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand*, 1999;100(1), 34-41.
- Dodel, R. Towards a vaccine against Alzheimer's? *Drug Res* 2013;63(1), 18-20. doi:10.1055/s-0033-1346715
- Doody, R., Thomas, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 2014;370(4), 311-321. doi:10.1056/NEJMoa1312889
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 2007;68(5), 384-386. doi:10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03
- Driver, J. A., Logroscino, G., Gaziano, J. M., Kurth, T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, 2009;72(5), 432-438. doi:10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., . DeKosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M. O., Jicha, G. A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L. C., Vellas, B., Visser, P. J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J. L. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*, 2014;13(6), 614-629. doi:10.1016/s1474-4422(14)70090-0
- Duyckaerts, C., Delatour, B., Potier, M. C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 2009;118(1), 5-36. doi:10.1007/s00401-009-0532-1
- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M., W., Luster, A. D. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*, 2003;197(12), 1657-1666. doi:10.1084/jem.20021546
- el-Agnaf, O. M., Irvine, G. B. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem Soc Trans*, 2002;30(4), 559-565. doi:10.1042/bst0300559.
- Engvall, E., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971;8(9), 871-874.

- Fan, H., Tang, H. B., Kang, J., Shan, L., Song, H., Zhu, K., Wang, J., Ju, G., Wang, Y. Z. Involvement of endoplasmic reticulum stress in the necroptosis of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neuroscience*, 2015;311, 362-373. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.049
- Farber, K., Pannasch, U., Kettenmann, H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 2005;29(1), 128-138. doi:10.1016/j.mcn.2005.01.003
- Fearnley, J. M., Lees, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 1991;114(Pt 5), 2283-2301.
- Fedoroff, N. Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann Bot*, 2006;98(2), 289-300. doi:10.1093/aob/mcl128
- Fonseca, A. C., Ferreira, E., Oliveira, C. R., Cardoso, S. M., Pereira, C. F. Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2013;1832(12), 2191-2203. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.007
- Fonseca, S. G., Gromada, J., Urano, F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol Metab*, 2011;22(7), 266-274. doi:10.1016/j.tem.2011.02.008
- Forno, L. S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996;55(3), 259-272.
- Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., Cole, G. M. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*, 1998;152(1), 307-317.
- Frost, J. L., Schafer, D. P. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol*, 2016;26(8), 587-597. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.006
- Fuger, P., Hefendehl, J. K., Veeraraghavalu, K., Wendeln, A. C., Schlosser, C., Obermüller, U., Wegenast-Braun, B., M., Neher, J. J., Martus, P., Kohsaka, S., Thunemann, M., Feil, R., Sisodia, S. S., Skodras, A., Jucker, M. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci*, 2017;20(10), 1371-1376. doi:10.1038/nn.4631
- Gaut, J. R., Hendershot, L. M. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 1993;5(4), 589-595.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., Brooks, D. J. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2006;21(2), 404-412. doi:10.1016/j.nbd.2005.08.002
- Gething, M. J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*, 1999;10(5), 465-472. doi:10.1006/scdb.1999.0318
- Glenner, G. G. Congophilic microangiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's syndrome (presenile dementia). *Med Hypotheses*, 1979;5(11), 1231-1236.
- Glenner, G. G., Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984;120(3), 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A.,

- Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., Hardy, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991;349(6311), 704-706. doi:10.1038/349704a0
- Gold, M., Mengel, D., Roskam, S., Dodel, R., Bach, J. P. Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against beta-amyloid on microglia. *J Neuroinflammation*, 2013;10, 5. doi:10.1186/1742-2094-10-5
- Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J., Pizzo, S. V. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*, 2009;11(9), 2299-2306. doi:10.1089/ars.2009.2568
- Goodwin, J. L., Kehrl, M. E., Jr., Uemura, E. Integrin Mac-1 and beta-amyloid in microglial release of nitric oxide. *Brain Res*, 1997;768(1-2), 279-286.
- Gorlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*, 2006;8(9-10), 1391-1418. doi:10.1089/ars.2006.8.1391
- Griffin, W. S. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*, 2006;83(2), 470-474.
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jennum, P., Jordanova, A., Jonsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., Linde, M., Ljungcrantz, C., Maercker, A., Melin, B., Moscarelli, M., Musayev, A., Norwood, F., Preisig, M., Pugliatti, M., Rehm, J., Salvador-Carulla, L., Schlehofer, B., Simon, R., Steinhausen, H. C., Stovner, L. J., Vallat, J. M., Van den Bergh, P., van Os, J., Vos, P., Xu, W., Wittchen, H. U., Jonsson, B., Olesen, J. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2011;21(10), 718-779. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.08.008
- Haass, C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo j*, 2004;23(3), 483-488. doi:10.1038/sj.emboj.7600061
- Haass, C., Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007;8(2), 101-112. doi:10.1038/nrm2101
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothee, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., de Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., Sarazin, M. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain*, 2016;139(Pt 4), 1252-1264. doi:10.1093/brain/aww017
- Han, J., Back, S. H., Hu, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., Kaufman, R. J. *Nat Cell Biol*, 2013;15(5) 481-90. doi:10.1038/ncb2738
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 1999;397(6716), 271-274. doi:10.1038/16729
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T. Leiden, J. M., Ron, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 2003;11(3), 619-633.

- Hardy, J. A., Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992;256(5054), 184-185.
- Henry, V., Paille, V., Lelan, F., Brachet, P., Damier, P. Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009;68(10), 1092-1102. doi:10.1097/NEN.0b013e3181b767b4
- Holdorff, B., Rodrigues e Silva, A. M., Dodel, R. Centenary of Lewy bodies (1912-2012). *J Neural Transm*, 2013;120(4), 509-516. doi:10.1007/s00702-013-0984-2
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J. S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2009;186(3), 323-331. doi:10.1083/jcb.200903014
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A., Rozemuller, J. M., Scheper, W. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007;354(3), 707-711. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.043
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., Eikelenboom, P., Scheper, W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol*, 2009;174(4), 1241-1251. doi:10.2353/ajpath.2009.080814
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., Scheper, W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, 2012;10(1-4), 212-215. doi:10.1159/000334536
- Hornykiewicz, O. The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr*, 1963;75, 309-312.
- Hornykiewicz, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev*, 1966;18(2), 925-964.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J., Exton, J. H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol*, 2006;26(8), 3071-3084. doi:10.1128/mcb.26.8.3071-3084.2006
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Ben-Shlomo, Y., Lees, A. J. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain*, 2002;125(Pt 4), 861-870.
- Ii, M., Sunamoto, M., Ohnishi, K., Ichimori, Y. beta-Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. *Brain Res*, 1996;720(1-2), 93-100. doi:10.1016/0006-8993(96)00156-4
- Jeohn, G. H., Kong, L. Y., Wilson, B., Hudson, P., Hong, J. S. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J Neuroimmunol*, 1998;85(1), 1-10.
- Jonson, M., Pokrzywa, M., Starkenberg, A., Hammarstrom, P., Thor, S. Systematic Aβ Analysis in Drosophila Reveals High Toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 Peptides, and Emphasizes N- and C-Terminal Residues. *PLoS One*, 2015;10(7), e0133272. doi:10.1371/journal.pone.0133272

- Jonsson, T., Atwal, J., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., Jönsson, E.G., Palotie, A., Behrens, T.W., Magnusson, O.T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R.J., Stefansson, K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 2012;488(7409), 96-99. doi:10.1038/nature11283.
- Kalia, L. V., Lang, A. E. Parkinson's disease. *Lancet*, 2015;386(9996), 896-912. doi:10.1016/s0140-6736(14)61393-3
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R. APP processing and synaptic function. *Neuron*, 2003;37(6), 925-937.
- Kamiya, T., Hara, H., Adachi, T. Effect of endoplasmic reticulum (ER) stress inducer thapsigargin on the expression of extracellular-superoxide dismutase in mouse 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Biochem Nutr*, 2013;52(2), 101-105. doi:10.3164/jcbrn.12-46
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 1987;325(6106), 733-736. doi:10.1038/325733a0
- Kawahara, K., Oyadomari, S., Gotoh, T., Kohsaka, S., Nakayama, H., Mori, M. Induction of CHOP and apoptosis by nitric oxide in p53-deficient microglial cells. *FEBS Lett*, 2001;506(2), 135-139.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., Glabe, C. G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003;300(5618), 486-489. doi:10.1126/science.1079469
- Kelliher, M., Fastbom, J., Cowburn, R. F., Bonkale, W., Ohm, T. G., Ravid, R., Sorrentino, V., O'Neill, C. Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience*, 1999;92(2), 499-513.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 2011;91(2), 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Kidd, M. Alzheimer's Disease - An Electron Microscopical Study. *Brain*, 1964;87, 307-320.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K. D., Smith, S. J., Kim, M. L., Lee, V. M., Hyman, B. T., Spires-Jones, T. L. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106(10), 4012-4017. doi:10.1073/pnas.0811698106
- Kokame, K., Kato, H., Miyata, T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem*, 2001;276(12), 9199-9205. doi:10.1074/jbc.M010486200
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the

- induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 1988;332(6163), 462-464. doi:10.1038/332462a0
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227(5259), 680-685.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 1990;39(1), 151-170.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*, 2003;23(21), 7448-59 doi:10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003
- Lee, A. S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*, 2001;26(8), 504-510.
- Lee, D. Y., Lee, K. S., Lee, H. J., Kim, D. H., Noh, Y. H., Yu, K., Jung, H. Y., Lee, S. H., Lee, J. Y., Youn, Y. C., Jeong, Y., Kim, D. K., Lee, W. B., Kim, S. S. Activation of PERK signaling attenuates Abeta-mediated ER stress. *PLoS One*, 2010;5(5), e10489. doi:10.1371/journal.pone.0010489
- Lee, H., Im, S. W., Jung, C. H., Jang, Y. J., Ha, T. Y., Ahn, J. Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic beta-cell through JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016;469(3), 748-752. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.036
- Lee, J. H., Won, S. M., Suh, J., Son, S. J., Moon, G. J., Park, U. J., Gwag, B. J. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med*, 2010;42(5), 386-394. doi:10.3858/emmm.2010.42.5.040
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., Selkoe, D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 2009;62(6), 788-801. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.012
- Li, Y., Yang, J., Chen, M. H., Wang, Q., Qin, M. J., Zhang, T., Chen, X. Q., Liu, B. L., Wen, X. D. Ilexgenin A inhibits endoplasmic reticulum stress and ameliorates endothelial dysfunction via suppression of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in an AMPK dependent manner. *Pharmacol Res*, 2015;99, 101-115. doi:10.1016/j.phrs.2015.05.012
- Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., Chen, Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014;46(8), 629-40. doi: 10.1093/abbs/gmu048
- Liu, Y., Schubert, D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem*, 1997;69(6), 2285-2293
- Liu, Y., Yang, X., Lei, Q., Li, Z., Hu, J., Wen, X., Wang, H., Liu, Z. PEG-PEI/siROCK2 Protects Against Abeta42-Induced Neurotoxicity in Primary Neuron Cells for Alzheimer Disease. *Cell Mol Neurobiol*, 2015;35(6), 841-848. doi:10.1007/s10571-015-0178-6
- Lopez Sanchez, M., van Wijngaarden, P., Trounce, I. Amyloid precursor protein-mediated mitochondrial regulation and Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*, 2019; 176(18):3464-3474. doi: 10.1111/bph.14554
- Lopez Sanchez, M. I. G., Waugh, H. S., Tsatsanis, A., Wong, B. X., Crowston, J. G., Duce, J. A., & Trounce, I. A. Amyloid precursor protein drives down-regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation independent

- of amyloid beta. *Scientific Reports*, 2017;7(1), 9835. doi:10.1038/s41598-017-10233-0
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 1999;155(3), 853-862.
- Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 1991;266(26), 17067-17071.
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 1998;8(11), 425-427.
- Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J. B., Medhurst, A. D., Dexter, D. T. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2009;110(3), 966-975. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06189.x
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 2001;21(4), 1249-1259. doi:10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., McGeer, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 1988;38(8), 1285-1291.
- McGuire, S. O., Ling, Z. D., Lipton, J. W., Sortwell, C. E., Collier, T. J., Carvey, P. M. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol*, 2001;169(2), 219-230. doi:10.1006/exnr.2001.7688
- Mengel, D., Roskam, S., Neff, F., Balakrishnan, K., Deuster, O., Gold, M., Oertel, W. H., Bacher, M., Bach, J. P., Dodel, R. Naturally occurring autoantibodies interfere with beta-amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*, 2013;3, e236. doi:10.1038/tp.2012.151
- Mhaille, A. N., McQuaid, S., Windebank, A., Cunnea, P., McMahon, J., Samali, A., FitzGerald, U. Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008;67(3), 200-211. doi:10.1097/NEN.0b013e318165b239
- Miani, M., Colli, M. L., Ladriere, L., Cnop, M., Eizirik, D. L. Mild endoplasmic reticulum stress augments the proinflammatory effect of IL-1beta in pancreatic rat beta-cells via the IRE1alpha/XBP1s pathway. *Endocrinology*, 2012;153(7), 3017-3028. doi:10.1210/en.2011-2090
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., Tanaka, J. Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, 2002;43(6), 1026-1034. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00211-3
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R. J., Shirasaki, Y., Greenberg, M. E. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase

- pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*, 2001;21(19), 7551-7560.
- Mrak, R. E. Microglia in Alzheimer brain: a neuropathological perspective. *Int J Alzheimers Dis*, 2012;2012, 165021. doi:10.1155/2012/165021
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 2000;403(6765), 98-103. doi:10.1038/47513
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., DeStefano, A. L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M. F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J. H., Cheng, R., Ikram, M. A., Ioannidis, J. P., Hadjigeorgiou, G. M., Bis, J. C., Martinez, M., Perlmutter, J. S., Goate, A., Marder, K., Fiske, B., Sutherland, M., Xiromerisiou, G., Myers, R. H., Clark, L. N., Stefansson, K., Hardy, J. A., Heutink, P., Chen, H., Wood, N. W., Houlden, H., Payami, H., Brice, A., Scott, W. K., Gasser, T., Bertram, L., Eriksson, N., Foroud, T., Singleton, A. B. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 2014;46(9), 989-993. doi:10.1038/ng.3043
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J. D. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama*, 2000;283(12), 1571-1577. doi: 10.1001/jama.283.12.1571
- Ni Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., Fitzgerald, U. Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol Commun*, 2013;1, 37. doi:10.1186/2051-5960-1-37
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, 2002;16(11), 1345-1355. doi:10.1101/gad.992302
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, 2001;153(5), 1011-1022.
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., Schrag, A. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*, 2012;72(6), 893-901. doi:10.1002/ana.23687
- Pahl, H. L., Baeuerle, P. A. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *Embo j*, 1995;14(11), 2580-2588.
- Painter, M. M., Atagi, Y., Liu, C. C., Rademakers, R., Xu, H., Fryer, J. D., Bu, G. TREM2 in CNS homeostasis and neurodegenerative disease. *Mol Neurodegener*, 2015;10(1), 43. doi:10.1186/s13024-015-0040-9
- Pan, X. D., Zhu, Y. G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q. Y., Huang, H. P., Chen, X. C. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 2011;6, 45. doi:10.1186/1750-1326-6-45

- Prince, M., Ali, G. C., Guerchet, M., Prina, A. M., Albanese, E., Wu, Y. T. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimers Res Ther*, 2016;8(23). doi:10.1186/s13195-016-0188-8
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y. T., Prina, M. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends - WorldAlzheimerReport2015.pdf. 2015; abgerufen von <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>, abgerufen am 31.12.2018
- Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982;216(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B., Woerman, A. L., Mordes, D. A., Watts, J. C., Rampersaud, R., Berry, D. B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J. K., Kravitz, S. N., Geschwind, D. H., Glidden, D. V., Halliday, G. M., Middleton, L. T., Gentleman, S. M. Grinberg, L. T., Giles, K. Evidence for alpha-synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(38); E5308-17; doi:10.1073/pnas.1514475112
- Querfurth, H. W., Jiang, J., Geiger, J. D., Selkoe, D. J. Caffeine stimulates amyloid beta-peptide release from beta-amyloid precursor protein-transfected HEK293 cells. *J Neurochem*, 1997;69(4), 1580-1591
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., Federico, A. Apoptosis in neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis*, 2014;42(3), 125-52. doi:10.3233/JAD-132738
- Reese, J. P., Hessmann, P., Seeberg, G., Henkel, D., Hirzmann, P., Rieke, J., Baum, E., Dannhoff, F., Muller, M. J., Jessen, F., Geldsetzer, M. B., Dodel, R. Cost and care of patients with Alzheimer's disease: clinical predictors in German health care settings. *J Alzheimers Dis*, 2011;27(4), 723-736. doi:10.3233/jad-2011-110539
- Resende, R., Ferreira, E., Pereira, C., Oliveira, C. R. ER stress is involved in Abeta-induced GSK-3beta activation and tau phosphorylation. *J Neurosci Res*, 2008;86(9), 2091-2099. doi:10.1002/jnr.21648
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. 2004; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; Bethesda (MD)
- Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W. P., Brown, W. T. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1987;1(8529), 384-385
- Rodrigues e Silva, A. M., Geldsetzer, F., Holdorff, B., Kielhorn, F. W., Balzer-Geldsetzer, M., Oertel, W. H., Hurtig, H., Dodel, R. Who was the man who discovered the "Lewy bodies"? *Mov Disord*, 2010;25(12), 1765-1773. doi:10.1002/mds.22956
- Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*, 2002;110(10), 1383-1388. doi:10.1172/jci16784
- Ronicke, R., Klemm, A., Meinhardt, J., Schroder, U. H., Fandrich, M., Reymann, K. G. Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*, 2008;3(9), e3236.

- doi:10.1371/journal.pone.0003236
- Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., Ron, D., Greene, L. A. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2002;22(24), 10690-10698.
- Sato, K. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia*, 2015;63(8), 1394-1405. doi:10.1002/glia.22858
- Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J., Katayama, T., Yoneda, T., Morihara, T., Yasuda, Y., Takagi, T., Kudo, T., Tsuda, T., Itoyama, Y., Makifuchi, T., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P., Tohyama, M. Increased production of beta-amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. *J Biol Chem*, 2001;276(3), 2108-2114. doi:10.1074/jbc.M006886200
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., Kaufman, R. J. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 2001;7(6), 1165-1176.
- Schrag, A., Jahanshahi, M., Quinn, N. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000;69(3), 308-312.
- Schroder, M., Kaufman, R. J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 2005;74, 739-789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 2000;404(6779), 770-774. doi:10.1038/35008096
- Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1991;6(4), 487-498.
- Selkoe, D. J. SnapShot: pathobiology of Alzheimer's disease. *Cell*, 2013;154(2), 468-468.e461. doi:10.1016/j.cell.2013.07.003
- Selkoe, D. J., Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 2016;8(6), 595-608. doi:10.15252/emmm.201606210
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011;1(1), a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Liederburg, I., Schenk, D., Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 1992;359(6393), 325-327. doi:10.1038/359325a0
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Quian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M. S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R. H., Arnold, H. M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R. M., Sandrock, A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 2016;537(7618), 50-56. doi:10.1038/nature19323

- Shamu, C. E., Cox, J. S., Walter, P. The unfolded-protein-response pathway in yeast, *Trends Cell Biol.* 1994;4(2), 56-60
- Shaulian, E., Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5), E131-136. doi:10.1038/ncb0502-e131
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002;3(1), 99-111.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M., St George-Hyslop, P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995;375(6534), 754-760. doi:10.1038/375754a0
- Simola, N., Morelli, M., Carta, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2007;11(3-4), 151-167.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., Sil, P. C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87(7), 1157-1180. doi:10.1007/s00204-013-1034-4
- Smith, W. W., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Ross, C. A. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet.* 2005;14(24), 3801-3811. doi:10.1093/hmg/ddi396
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sanchez, C. L., Meares, G. P. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1), 42. doi:10.1186/s13024-017-0183-y
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2018. abgerufen von https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/Gesundheit.pdf?__blob=publicationFile, abgerufen am 01.01.2019
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., Moore, K. J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2010;11(2), 155-161. doi:10.1038/ni.1836
- Streit, W., Braak, H., Del Tredici, K., Leyh, J., Koshbouei, H., Eisenlöffel, C., Müller, W., Bechmann, I. Microglial activation occurs late during preclinical Alzheimer's disease. *Glia.* 2018;66(12), 2550-2562. doi:10.1002/glia.23510
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7(9), 880-885. doi:10.1038/sj.embor.7400779
- Terrill-Usery, S. E., Mohan, M. J., Nichols, M. R. Amyloid-beta(1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1beta despite significant intracellular IL-1beta accumulation in microglia. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(11), 2276-2285. doi:10.1016/j.bbadis.2014.08.001
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., Walter, P. Functional and genomic analyses reveal an essential

- coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 2000;101(3), 249-258.
doi:10.1016/s0092-8674(00)80835-1
- Trepel, M. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*, 2008;4. Auflage: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
- Tsujii, S., Ishisaka, M., Shimazawa, M., Hashizume, T., Hara, H. Zonisamide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell damage in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, 2015;746, 301-307.
doi:10.1016/j.ejphar.2014.09.023
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 2000;287(5453), 664-666.
doi:10.1126/science.287.5453.664
- Van Kampen, J. M., McGeer, E. G., Stoessl, A. J. Dopamine transporter function assessed by antisense knockdown in the rat: protection from dopamine neurotoxicity. *Synapse*, 2000;37(3), 171-178.
doi:10.1002/1098-2396(20000901)37:3<171::aid-syn1>3.0.co;2-r
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J., Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 2011;731, 237-245. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20
- VanGuilder, H. D., Bixler, G. V., Brucklacher, R. M., Farley, J. A., Yan, H., Warrington, J. P., Sonntag, W. E., Freeman, W. M. Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *J Neuroinflammation*, 2011;8, 138. doi:10.1186/1742-2094-8-138
- Vargas, K. J., Makani, S., Davis, T., Westphal, C. H., Castillo, P. E., Chandra, S. S. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*, 2014;34(28), 9364-9376. doi:10.1523/jneurosci.4787-13.2014
- Varma, D., Sen, D. Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp*, 2015;75(1), 1-26.
- Viana, R. J., Nunes, A. F., Rodrigues, C. M. Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2012;46(2), 522-534.
doi:10.1007/s12035-012-8301-x
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Botzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K., Dodel, R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005;15(4), 473-490. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.04.007
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R. J., Prywes, R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*, 2000;275(35), 27013-27020.
doi:10.1074/jbc.M003322200
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 2000;14(16), 2060-2071.
- Weyerer, S. Altersdemenz. 2005 abgerufen von
http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/ren4T3cctjHcA/PDF/22wKC7IPbmP4M_43.pdf, abgerufen am 22.05.2016
- Whitton, P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*, 2007;150(8), 963-976.

- doi:10.1038/sj.bjp.0707167
- WHO, Alzheimer's Disease International. Dementia: a public health priority, 2015 abgerufen von
doi:/entity/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/index.html, abgerufen am 31.10.2015
- Wu, J., Kaufman, R. J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ*, 2006;13(3), 374-384. doi:10.1038/sj.cdd.4401840
- Xie, N., Wu, C., Wang, C., Cheng, X., Zhang, L., Zhang, H., Lian, Y. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter inhibits Abeta-induced apoptosis by reducing reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress in cultured microglia. *Brain Res*, 2017;1676, 100-106. doi:10.1016/j.brainres.2017.08.035
- Xu, S., Zhao, X., Zhao, Q., Zheng, Q., Fang, Z., Yang, X., Wang, H., Liu, P., Xu, H. Wogonin prevents rat dorsal root ganglion neurons death via inhibiting tunicamycin-induced ER stress in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, 2015;35(3), 389-398. doi:10.1007/s10571-014-0134-x
- Yamamuro, A., Yoshioka, Y., Ogita, K., Maeda, S. Involvement of endoplasmic reticulum stress on the cell death induced by 6-hydroxydopamine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*, 2006;31(5), 657-664. doi:10.1007/s11064-006-9062-6
- Yan, J. Q., Sun, J. C., Zhai, M. M., Cheng, L. N., Bai, X. L., Feng, C. L. Lovastatin induces neuroprotection by inhibiting inflammatory cytokines in 6-hydroxydopamine treated microglia cells. *Int J Clin Exp Med*, 2015;8(6), 9030-9037.
- Yan, W., Frank, C. L., Korth, M. J., Sopher, B. L., Novoa, I., Ron, D., Katze, M. G. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99(25), 15920-15925. doi:10.1073/pnas.252341799
- Yates, S. L., Burgess, L. H., Kocsis-Angle, J., Antal, J. M., Dority, M. D., Embury, P. B., Piotrkowski, A. M., Brunden, K. R. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem*, 2000;74(3), 1017-1025.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., Goldstein, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*, 2000;6(6), 1355-1364.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*, 2001;276(17), 13935-13940. doi:10.1074/jbc.M010677200
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*, 1998;273(50), 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to

- produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001;107(7), 881-891. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0
- Yuan, Y., Cao, P., Smith, M. A., Kramp, K., Huang, Y., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Hatzoglou, M., Jin, H., Feng, Z. Dysregulated LRRK2 signaling in response to endoplasmic reticulum stress leads to dopaminergic neuron degeneration in *C. elegans*. *PLoS One*, 2011;6(8), e22354. doi:10.1371/journal.pone.0022354
- Zeng, X. S., Jia, J. J., Kwon, Y., Wang, S. D., Bai, J. The role of thioredoxin-1 in suppression of endoplasmic reticulum stress in Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 2014;67, 10-18. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.013
- Zhang, L., Wang, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front Plant Sci*, 2012;3, 293. doi:10.3389/fpls.2012.00293
- Ziegler, U., Doblhammer, G. Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002. *Gesundheitswesen*, 2009;71(5), 281-290. doi:10.1055/s-0028-1119384
- Zilliken, F. Cell differentiation and epigenetic regulation. *Acta Neuroveg*, 1967;30(1), 4-18.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., Ron, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 1998;12(7), 982-995.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothese der Amyloidkaskade.....	10
Abbildung 2: UPR Signalwege.	20
Abbildung 3: ER-Stress assoziierte Apoptose.	23
Abbildung 4: ER-Sress induzierte Inflammation.....	28
Abbildung 5: Einfluss von 6-OHDA auf die neuronale Zellviabilität.	50
Abbildung 6: Einfluss von 6-OHDA auf die neuronale Zellvitalität.	51
Abbildung 7: Neuronale ER-Stress Marker nach Inkubation mit 6-OHDA.	54
Abbildung 8: Einfluss von 6-OHDA auf die mikrogliale Zellviabilität.	55
Abbildung 9: Einfluss von 6-OHDA auf die mikrogliale Zellvitalität.	56
Abbildung 10: Einfluss von 6-OHDA auf die Zytokinausschüttung.	57
Abbildung 11: Einfluss von 6-OHDA auf die Nitritausschüttung.	58
Abbildung 12: Mikrogliale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit 6-OHDA.	59
Abbildung 13: Expression von CHOP in mikroglialen Zellen.	60
Abbildung 14: Einfluss von A β 1-42 auf die neuronale Zellviabilität.....	61
Abbildung 15: Einfluss von A β 1-42 auf die neuronale Zellvitalität.	62
Abbildung 16: Neuronale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit A β 1-42.....	64
Abbildung 17: Einfluss von A β 1-42 auf die mikrogliale Zellviabilität.	66
Abbildung 18: Einfluss von A β 1-42 auf die mikrogliale Zellvitalität.....	67
Abbildung 19: Einfluss von A β 1-42 auf die Zytokinausschüttung.	68
Abbildung 20: Einfluss von A β 1-42 auf die Nitritausschüttung.....	69
Abbildung 21: Mikrogliale ER-Stress-Marker nach Inkubation mit A β 1-42.	70
Abbildung 22: Ergebnisse der Schädigungsmodelle.....	84

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:Geräte	33
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 3: Chemikalien	35
Tabelle 4: Kits und Lösungen.....	36
Tabelle 5: Medien und Zusätze	37
Tabelle 6: Primärantikörper	39
Tabelle 7: Sekundärantikörper	39

11 Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid-beta
A β 1-42	Amyloid-beta 1-42
A β 1-40	Amyloid-beta 1-40
AD	Alzheimer Krankheit (englisch: <i>Alzheimer`s Disease</i>)
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (englisch: <i>Amyloid-Precursor Protein</i>)
ASK1	englisch: <i>apoptosis-signal-regulating kinase</i>
ATF4	englisch: <i>Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	englisch: <i>Activating Transcription Factor 6</i>
BACE	englisch: <i>β-site APP-cleaving enzyme</i>
Bak	englisch: <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bcl-2	englisch: <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bax	englisch: <i>Bcl-2-like proteine 4</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BH3	englisch: <i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BSA	bovine serum albumine
bZIP	englisch: <i>basic leucin Zipper</i>
CBD	Kortikobasale Degeneration
CGN	englisch: <i>cerebellar granule neurons</i>
CH ₄ O	Methanol
CHOP	englisch: <i>C/EBP Homologous Protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRE	englisch: <i>ATF/cAMP response element</i>
DAT	Dopamintransporter
DLK	Demenz mit Lewy-Körpern
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ED	Enzephalomyelitis Disseminata
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	englisch: <i>Eukaryotic Initiation Factor 2α</i>
ELISA	englisch: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERAD	englisch: <i>Endoplasmic-reticulum associated protein degradation</i>
ERSE-1	englisch: <i>ER-Stress response elements-1</i>
ERSE-2	englisch: <i>ER-Stress response elements-2</i>
FCS	Fetales Kälberserum (englisch: <i>fetal calf serum</i>)
FDA	Fluoreszeinacetat
GADD 34	englisch: <i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible Gene 34</i>
GMCSF	englisch: <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GRP78	englisch: <i>Glucose Regulated Protein 78</i>
GSK3 β	englisch: <i>Glycogensynthase-kinase 3 beta</i>
HCL	Hydrogenchlorid
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: <i>Horseradish peroxidase</i>)
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat, Schwefelsäure
I κ B	englisch: <i>Inhibitors of κB</i>
ICD-10	englisch: <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin 6
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
IRE1 α	englisch: <i>Inositol-Requiring Enzyme 1α</i>
JNK	englisch: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	englisch: <i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
LTD	englisch: <i>Long Term Depression</i>
LTP	Langzeitpotenzierung (englisch: <i>Long Term Potentiation</i>)
MAO	Monoaminoxidase
MSA	Multisystematrophie
MTT	Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide
NaCl	Natriumchlorid

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAT	Noradrenalintransporter
NFκB	englisch: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NFTs	Neurofibrillenbündel (englisch: <i>Neurofibrilläre Tangles</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PD	Parkinson Krankheit (englisch: <i>Parkinson's Disease</i>)
PEI	Polyethylenimine
PERK	englisch: <i>Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase</i>
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Parkinsonsyndrom
PSP	Progressive Supranukleäre Paralyse
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
RBE4	englisch: <i>rat brain endothelial cells</i>
REM	englisch: <i>Rapid Eye Movement</i>
RIDD	englisch: <i>Regulated IRE Dependent Decay</i>
RNase	Endoribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (englisch: <i>reactive oxygen species</i>)
SERCA	Sarko- und Endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
S1P, S2P	englisch: <i>site-1 und site-2 Protease</i>
TBST	englisch: <i>Tris buffered saline with Tween</i>
TLR	englisch: <i>toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α

TRAF2	englisch: <i>TNF-receptor-associated factor-2</i>
TREM2	englisch: <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
UPR	englisch: <i>Unfolded Protein Response</i>
XBP1	englisch: <i>X Box Binding Protein 1</i>

12 Anhang

12.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Lübeck waren die Damen und Herren:

Anemüller, Barkhausen, Borck, Dunst, Eggers, Feller, Gillessen-Kaesbach, Häuser, Hartmann, Hübner, Jelkmann, Kramer, Krüger, Münte, Pagel, Peters, Solbach, Weiss, Weitz, Westermann, Werner, Willkomm

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Baum, Bartsch, Bien, Czubayko, Dettmeyer, Dodel, Gress, Hertl, Hofmann, Hoyer, Josephs, Kircher, Köhler, König, Kruse, Kussin, Lohoff, Maier, Moll, Moosdorf, Neubauer, Nimsky, Oertel, Riera-Knorrenschild, Ruchholtz, Schneider, Schnoor, Sekundo, Wagner, Wulf, Westermann, Zovko

12.2 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Dodel für seine Betreuung und Anregungen zu dieser Arbeit. Auch für die Möglichkeit zur Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. Günther in Gießen und insbesondere für die Teilnahmemöglichkeit an einem internationalen Kongress möchte ich mich hier bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Carmen Nölker als Ideengeberin zu diesem Projekt und als immer verfügbare Ansprechpartnerin bei Problemen und Fragen. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir mit ihrem motivierenden Optimismus stets zur Seite.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dodel danke ich für Ihre freundliche Aufnahme ins Team und immerwährende Hilfsbereitschaft.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günther danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern.

Dr. Maike Gold möchte ich für ihre Freundschaft und die Hilfestellung bei der alltäglichen Laborarbeit danken.

Schlussendlich möchte ich auch meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt haben und deren Unterstützung ich meine gesamte Ausbildung genießen konnte.

Der größte Dank gebührt meinem Mann, der stets an meiner Seite ist.